

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



09/30109898

## 日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 18 DEC 1998

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

1997年10月 3日

出願番号  
Application Number:

平成 9年特許願第271726号

出願人  
Applicant(s):

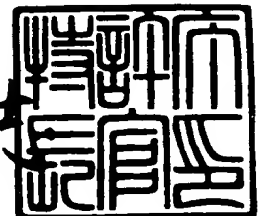
中外製薬株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1998年12月 4日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平10-309670

【書類名】 特許願

【整理番号】 974381

【提出日】 平成 9年10月 3日

【あて先】 特許庁長官 荒井 寿光 殿

【国際特許分類】 C12N 15/13

【発明の名称】 天然ヒト型化抗体

【請求項の数】 13

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1-135 中外製薬株式会社内

【氏名】 土屋 政幸

【特許出願人】

【識別番号】 000003311

【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100077517

【弁理士】

【氏名又は名称】 石田 敬

【電話番号】 03-5470-1900

【選任した代理人】

【識別番号】 100087871

【弁理士】

【氏名又は名称】 福本 積

【選任した代理人】

【識別番号】 100088269

【弁理士】

【氏名又は名称】 戸田 利雄

【選任した代理人】

【識別番号】 100082898

【弁理士】



【氏名又は名称】 西山 雅也

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 036135

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9207941

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 天然ヒト型化抗体

【特許請求の範囲】

【請求項1】 1次デザイン抗体のFRに対する相同性検索を行い、1次デザイン抗体のFRに含まれる人工的なアミノ酸残基を保持し且つ相同性を有する天然ヒトFRを選択することからなる、天然ヒト型化抗体の製造方法。

【請求項2】 1次デザイン抗体のFRに対する相同性検索を行い、1次デザイン抗体のFRに含まれる人工的なアミノ酸残基を保持し且つ相同性を有する天然ヒトFRを選択し、次いで1次デザイン抗体のFRと選択した天然FRとで異なる1又は複数個のアミノ酸残基を置換することからなる、請求項1に記載の天然ヒト型化抗体の製造方法。

【請求項3】 1次デザイン抗体が第一の動物種由来のCDR 及び人工的なアミノ酸残基を含む第二の動物種由来のFRからなる、請求項1又は2に記載の製造方法。

【請求項4】 第一の動物種がマウス又はラットであり、第二の動物種がヒトである、請求項3に記載の製造方法。

【請求項5】 人工的なアミノ酸残基が非ヒト抗体FRに由来するアミノ酸残基である、請求項1～4のいずれか1項に記載の製造方法。

【請求項6】 請求項1～5のいずれか1項に記載の製造方法により得られた天然ヒト型化抗体。

【請求項7】 第一の動物種由来のCDR 及び第二の動物種由来のFRを含有する天然ヒト型化抗体であって、該FRが、CDR グラフティングに使用されたFRと1又は複数個のアミノ酸残基を異にするアミノ酸配列から成るものであり、且つ該異なるアミノ酸残基と同じアミノ酸残基を同じ位置に含有する第二の動物種由来のFRに置き換えられていることを特徴とする、天然ヒト型化抗体。

【請求項8】 第一の動物種がマウス又はラットであり、第二の動物種がヒトである、請求項7に記載の天然ヒト型化抗体。

【請求項9】 請求項6～8のいずれか1項に記載の天然ヒト型化抗体をコードするDNA。

【請求項10】 請求項9に記載のDNAを含む発現ベクター。

【請求項11】 請求項10に記載のDNAを含む宿主。

【請求項12】 請求項9に記載のDNAを含む発現ベクターを導入した細胞を培養し、該細胞の培養物から所望の天然ヒト型化抗体を得ることを特徴とする、天然ヒト型化抗体の製造方法。

【請求項13】 天然ヒト型化抗体を含有して成る医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、天然ヒト型化抗体の製造方法及び該製造方法により得られた天然ヒト型化抗体に関する。また、本発明は天然ヒト型化抗体をコードするDNA、該DNAを含む発現ベクター、該DNAを含む宿主、及び該DNAを導入した細胞から天然ヒト型化抗体の製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

マウスモノクローナル抗体は汎用のハイブリドーマ技術によって比較的容易に単離することができる (Kohler, G. and Milstein, C. Nature (1975) 256, 495-497)。一方、ヒトハイブリドーマも同様の技術構築が期待されたものの汎用技術には至っていない。また、臨床応用ではヒト抗原に対する抗体が求められ、それ故、マウスモノクローナル抗体の作成は抗体医薬の開発に不可欠である。

実際、癌細胞やウイルスに対する数々のマウスモノクローナル抗体が単離されその臨床応用が検討されてきた。ところが、マウス抗体はヒトでは異物であるため強い抗原性によるHAMA(Human Anti-Mouse Antibody)を誘導することや、ADCCの誘導作用が弱いなどの臨床応用に極めて不都合な問題が明らかにされた (Schröff, R. W., Cancer Res. (1985) 45, 879-885; Shawler, D. L., et al., J. Immunol. (1985) 135, 1530-1535)。

【0003】

この問題の解決のために、まず、キメラ抗体が作成された (Neuberger, M. S. et al., Nature (1984) 312, 604-608; Boulianne, G. L. et al., Nature (19

84) 312, 643-646)。キメラ抗体はマウス抗体の可変領域をヒト抗体の定常領域と連結したもので、特に強い抗原性の原因となる定常領域をヒト型に置換してなる。これは、ヒトFc受容体との生理的な結合を可能にしFcを介した機能を誘導することが期待される。実際、キメラ抗体を用いた臨床試験は抗原性の著しく低下を報告している (LoBuglio, A. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86, 4220-4224)。しかし、マウス可変領域に対するHAMAが今だ生じ、問題となるケースが明らかにされた (LoBuglio, A. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86, 4220-4224)。

#### 【0004】

そこで、より複雑ではあるがよりヒト抗体に近いヒト型化抗体の作成法が開発された。これは、マウス抗体の抗原結合部位をヒト抗体上に再構築する技術である (Jones, P.T. et al., Nature (1986) 321, 522-525; Verhoeyen, M. et al., Science (1988) 239, 1534-1536; Riechmann, L. et al., Nature (1988) 332, 323-327)。すなわち、抗体可変領域は、H鎖 (heavy chain)、L鎖 (light chain) 共に4個のフレームワーク領域 (Framework Region; FR) とそれらに挟まれた3個の相補性決定領域 (Complementarity Determining Region; CDR) によって構成される。

#### 【0005】

抗原結合部位の形成は主にCDRが担っており、さらにFR上の一部のアミノ酸残基が直接・間接にそれに関与することが知られる。各抗体の基本構造は類似した構造を有しているため、ある抗体の抗原結合部位を別の抗体に移植することが可能と考えられた。実際、G. Winterらの研究グループはマウス抗リゾチウム抗体のCDRsをヒト抗体に移植して (CDR-grafting) リゾチウム結合活性を有するヒト型化抗体の作成に成功した (Jones, P.T. et al., Nature (1986) 321, 522-525)。

#### 【0006】

しかし、CDR-graftingのみでヒト型化すると、元のマウス抗体と同等の抗原結合活性を有するヒト型化抗体を得ることができない場合がある。そのため、前述のとおり、一部のFRアミノ酸残基の置換が行われている。置換すべきFRアミノ酸

残基は抗体分子の基本構造を担うアミノ酸残基(canonical structure; Chothia, C. et al., Nature (1989) 342, 877-883; Chothia, C. and Lesk, A. M. J. Molec. Biol. (1987) 196, 901-917)やCDRの構造維持に関与し、あるいは直接抗原分子と相互作用するものである。

【0007】

実際、ほとんどのヒト型化抗体においてFR上のアミノ酸置換が施されており、そこには天然には見出されていない人工的なFR配列が形成される。時には、数多くのアミノ酸置換が施されており、マウス抗体の示す抗原性を出来る限りなくするためのCDR-graftingの本来の意義が疑われる(Queen, C, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86, 10029-10033; Co, M. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88, 2869-2873)。

【0008】

この問題の解決策はヒトFR選択に工夫を措くことである。すなわち、置換すべきFRアミノ酸残基の数はCDR-graftingに選択したヒト抗体FRsと元のマウス抗体のFRsとの相同性に依存するためである。従って、一般にヒトFRの選択はマウスFRsと相同性の高いものが選択され、最小の置換に留める努力が成される。しかしながら、こうして得られたヒト型化抗体のFRでさえ、多くの場合、これまでに天然には見出されていないアミノ酸配列を有しており、抗原性の発生する可能性が残されている。この問題を解決し、より抗原性の誘導される確率の低い、安全性のより高いヒト型化抗体を構築する技術が求められる。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、これまでのヒト型化抗体の構築法を改良し、元のマウス抗体の抗原結合活性を完全に保持し、かつ、全て天然に見出されているヒトFRで構成される、言い換えれば、FR上のアミノ酸置換を全く施さないヒト型化抗体の構築法を提供するものである。

【0010】

【課題を解決するための手段】

すなわち、本発明は、1次デザイン抗体のFRに対する相同性検索を行い、1次

デザイン抗体のFRに含まれる人工的なアミノ酸残基を保持し且つ相同性を有する天然ヒトFRを選択することからなる、天然ヒト型化抗体の製造方法を提供する。なお、1次デザイン抗体とは従来のCDR-graftingにより製造されるヒト型化抗体（あるいは再構成ヒト抗体と呼ばれる）である。

## 【0011】

本発明はまた、1次デザイン抗体のFRに対する相同性検索を行い、1次デザイン抗体のFRに含まれる人工的なアミノ酸残基を保持し且つ相同性を有する天然ヒトFRを選択し、次いで1次デザイン抗体のFRと選択した天然FRとで異なる1又は複数個のアミノ酸残基を置換することからなる、天然ヒト型化抗体の製造方法を提供する。

好ましくは、これらの製造方法において1次デザイン抗体は第一の動物種由来のCDR 及び人工的なアミノ酸残基を含む第二の動物種由来のFRからなる。さらに好ましくは、1次デザイン抗体において、第一の動物種が非ヒト哺乳動物であり、第二の動物種がヒトである。第一の動物種である非ヒト哺乳動物としては、例えばマウス、ラット、ハムスター、ウサギ、サルである。

## 【0012】

本発明はまた、1次デザイン抗体のFRに対する相同性検索を行い、1次デザイン抗体のFRに含まれる非ヒト抗体FRに由来するアミノ酸残基を保持し且つ高い相同性を有する天然ヒトFRを選択し、次いで1次デザイン抗体のFRと選択した天然FRとで異なる1又は複数個のアミノ酸残基を置換することからなる、天然ヒト型化抗体の製造方法を提供する。

本発明はまた、前記の製造方法により得られた天然ヒト型化抗体を提供する。

## 【0013】

本発明はまた、第一の動物種由来のCDR 及び第二の動物種由来のFRを含有する天然ヒト型化抗体であって、該FRが、CDR グラフティングに使用されたFRと1又は複数個のアミノ酸残基を異にするアミノ酸配列から成るものであり、且つ該異なるアミノ酸残基と同じアミノ酸残基を同じ位置に含有する第二の動物種由来のFRに置き換えられていることを特徴とする、天然ヒト型化抗体を提供する。好ましくは、第一の動物種が非ヒト哺乳動物であり、第二の動物種がヒトである。第

一の動物種である非ヒト哺乳動物としては、例えばマウス、ラット、ハムスター、ウサギ、サルである。

【0014】

本発明はまた、前記天然ヒト型化抗体をコードするDNAを提供する。

本発明はまた、前記DNAを含む発現ベクターを提供する。

本発明はまた、前記DNAを含む宿主を提供する。

本発明はさらに、前記DNAを含む発現ベクターを導入した細胞を培養し、該細胞の培養物から所望の天然ヒト型化抗体を得ることを特徴とする天然ヒト型化抗体の製造方法を提供する。

本発明はさらに、天然ヒト型化抗体を含有する医薬組成物を提供する。

【0015】

【発明の実施の形態】

1.天然FR配列

限られた抗体可変領域を構成する遺伝子から多様な抗原に対応する抗体を作り出すため、生体はsomatic mutationと呼ばれる抗体可変領域内にランダムな遺伝子変異を導入する機構を備えている。これにより、計算上は極めて多彩なFRアミノ酸配列が形成されるはずではあるが、実際に構造が明らかにされた多くのヒト抗体FRの構造解析から、変異の導入されやすいアミノ酸残基の位置やアミノ酸残基の種類がある程度は制限されているようである。

【0016】

なお、本発明で述べるFRとはKabat, E. A. et al., Sequence of Proteins of Immunological Interest (1991)により規定されるFRを意味する。すなわち、H鎖においてFR1はアミノ酸番号1～30、FR2はアミノ酸番号36～49、FR3はアミノ酸番号66～94及びFR4はアミノ酸番号103～113である。また、L鎖においてFR1はアミノ酸番号1～23、FR2はアミノ酸番号35～49、FR3はアミノ酸番号57～88及びFR4はアミノ酸番号98～107である。

【0017】

2.人工ヒトFRから天然ヒトFRへ

従来のCDR-grafting法によって構築されたヒト型化抗体（再構成ヒト抗体とも

呼ばれる)は、天然では見出されていないFRアミノ酸配列を有している場合が多い。しかし、前述の通り、体細胞変異 (somatic mutation) で多様なFRアミノ酸配列がすでに見出されており、ヒト型化によって生じた人工的なアミノ酸残基を含むFRを天然に存在するヒトFRに変換できる可能性が考えられる。

#### 【0018】

本発明は、従来のヒト型化技術で構築したヒト型化抗体をもう1ステップ加工することで、人工的なFRではなく天然に見出されるヒトFRから構成されるヒト型化抗体を作出するものである。FRのアミノ酸置換が施されたヒト型化抗体を既知のヒト抗体FRと既知のデータベースであるSwiss Plot (protein sequence database)、GenBank (nucleic acid sequence database)、PRF (protein sequence database)、PIR (protein sequence database)、GenPept (translated protein sequence from GenBank) を用いることにより相同性検索を実施すると、完全に一致したアミノ酸配列を有するヒトFRや相同性を有するヒトFRを見出す事ができる。

#### 【0019】

前者の場合、CDR-graftingのacceptorとして用いられたヒトFRから見ればFR置換が施された訳だが、作成された人工的なFRと考えられていたものが天然FRに存在し、これをacceptorとして捉えることが出来るから、FR置換が施されていないFRを得ることができる。後者の場合は、人工的なFRと相同性の高いヒトFRのアミノ酸配列に注目して、人工的なFR中に適当な天然のヒト抗体に戻るアミノ酸置換を施してその天然ヒトFRと完全に一致させることが可能である。この操作は、CDR-grafting抗体に対してヒト型化を行う事を意味している。

#### 【0020】

この場合、ヒト抗体同士のアミノ酸配列の相同性検索を行うため、選択されるヒトFRはCDR-graftingで用いられたヒトFRと同一のサブグループに属し、しかも極めて相同性の高いアミノ酸配列を見出す事が可能である。従って、各FRごとに得られる天然ヒトFRはそれぞれ異なった抗体に由来したとしてもサブグループのコンセンサス配列を十分以上に満たすものである。

#### 【0021】



### 3.天然配列ヒト型化抗体

本発明で得られる天然ヒト型化抗体は天然に存在が認められているヒト抗体FRで構成されている。FR1からFR4でそれぞれが異なる抗体に由来する場合があるが、前述の通り、ヒト抗体同士の相同性検索を行うことにより同一のサブグループに属する抗体のみ選択できる。同一のサブグループ内の各抗体のFR構造は極めて類似の構造を有し、実際にサブグループのコンセンサス配列を元にしたヒト型化抗体が作成されている (Kettleborough, C. A. et al., Protein Engng. (1991) 4, 773-783; Satoh, K. et al., Molec. Immun. (1994) 31, 371-381)。

#### 【0022】

前述の通り、抗体の場合はsomatic mutationにより極めて多様なアミノ酸配列が天然に存在すると考えられ、現在その構造が解析されたものはその一部である。得られたヒト型化抗体のFRの配列が天然に見出されない場合、そのFRが天然に存在するか否かは不明である。従って、医薬品として抗体を考えた場合、天然に見出されたヒトFRで構成されるCDR-grafting抗体の作製は、本来のヒト型化の目的である抗原性の低減という観点から、従来のヒト型化抗体より優れた性質を持つ抗体を提供するものである。

#### 【0023】

### 4.新規ヒト型化抗体構築法

本発明は、従来のヒト型化技術で構築されたヒト型化抗体の問題点、すなわち天然には見出されていない人工的なFRにより生ずる抗原性を解消するものであり、実際に天然に存在するヒトFRで構成されるCDR-graftingによるヒト型化抗体を構築する技術である。人工的なFRのアミノ酸配列とは、FR全体として天然に見出されていないFRのアミノ酸配列を意味する。また、FRに含まれる人工的なアミノ酸残基とは、FRに含まれる天然に見出されていないアミノ酸残基を意味する。

#### 【0024】

天然に見出されていないFRのアミノ酸配列とは、これまでのヒト型化抗体技術により作製されたヒト型化抗体において、例えばFRにおいてヒトのアミノ酸残基からヒト型化の鑄型である非ヒト哺乳動物由来の抗体のFRに存在するアミノ酸残基に戻ったアミノ酸配列を有するFRが挙げられる。あるいは、これまでのヒト型

化抗体技術により作製されたヒト型化抗体において、例えばFRにおいてヒトのアミノ酸残基からヒト及び非ヒト哺乳動物由来の抗体には見出されないアミノ酸配列を有するFRが挙げられる。

## 【0025】

以下に本発明の天然ヒト型化抗体の製造方法の手順を示す。

まず、従来の手法によりCDR-graftingに用いるヒト抗体FRを選択する。このFRにアミノ酸置換を加え、マウス抗体と同等以上の生物活性を有するヒト型化抗体を構築する。従来法ではこれはヒト型化抗体の最終産物とされるが、本発明においては天然配列を有する天然ヒト型化抗体作製のための中間産物にすぎない。本発明では、これを1次デザイン抗体と称する。

## 【0026】

次いで、1次デザイン抗体の各FRに対し相同性検索を実施する。完全に一致するFRについてはすでに天然FRで構成されている事になる。一方、完全には一致しないが、相同性を有する1次デザイン抗体FRと同一のサブグループに属する一連の天然ヒトFRがリストされる。特に1次デザイン抗体の構築において重要であった非ヒト哺乳動物、例えばマウス由来のFRのアミノ酸残基を保持し、かつ1次デザイン抗体と相同性を有する最適な天然ヒトFRをリストの中から選択する。

## 【0027】

FRの相同性検索を行うには、公知のデータベースを用いることにより行われる。このようなデータベースとしては、例えばSwiss Plot、GenBank、PRF、PIR、GenPeptが挙げられる。このようなデータベースを用いて相同性検索が行われるが、この相同性検索によりリストされる「1次デザイン抗体のFRと相同性を有するFR」とは、少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも91%、より好ましくは少なくとも92%、より好ましくは少なくとも93%、より好ましくは少なくとも94%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも96%以上、より好ましくは少なくとも97%以上、より好ましくは少なくとも98%以上、より好ましくは少なくとも99%以上、アミノ酸配列上の相同性を有するFRを意味する。

## 【0028】

1次デザイン抗体の構築において重要であった非ヒト哺乳動物のアミノ酸残基とは、人工的なFRに含まれる非ヒトFR由来のアミノ酸残基を意味する。このようなアミノ酸残基は、抗体分子の基本構造を担うアミノ酸残基(canonical structure)、CDRの構造維持に関与するアミノ酸残基あるいは直接抗原分子と相互作用するアミノ酸残基に多く見出され、抗体毎にも異なるが、例えばH鎖71位のアミノ酸、H鎖94位のアミノ酸等が挙げられる。

## 【0029】

上述のように、1次デザイン抗体FRと選択した天然FRで異なる1又は複数個のアミノ酸残基を天然ヒトFRのアミノ酸残基を有するように置換すれば、得られるヒト型化抗体(天然ヒト型化抗体;2次デザイン抗体と称する)はすべて天然FRにて構成される。この際、好ましくは全てのヒトFRは同一のサブグループに属するヒトFRであり、さらに好ましくは同一の抗体に由来する。また、全てのヒトFRが同一のサブグループのヒトFRではなくても、抗体として再構成され、適当な抗原結合活性が得られればそれでもよく、同一サブグループに属するヒトFRに限定するものではない。本発明において、複数個のアミノ酸残基とは、アミノ酸配列中の2個以上のアミノ酸残基、好ましくは、2個以上10個以下のアミノ酸残基、より好ましくは2個以上5個以下のアミノ酸残基、さらに好ましくは2個以上4個以下のアミノ酸残基、さらに好ましくは2個以上3個以下のアミノ酸残基である。

## 【0030】

人工的なFRと天然ヒトFRの相同性は、少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも91%、より好ましくは少なくとも92%、より好ましくは少なくとも93%、より好ましくは少なくとも94%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも96%以上、より好ましくは少なくとも97%以上、より好ましくは少なくとも98%以上、より好ましくは少なくとも99%以上、である。

## 【0031】

次いで、2次デザイン抗体を適当な発現系、例えば動物細胞で発現させ、その抗原結合活性等の評価を行う。

また、本発明の製造方法は必ずしも実際に1次デザイン抗体を構築しなくても行うことができる。すなわち、従来通りに1次デザイン抗体をデザインし、実際の抗原結合活性は評価せずに2次デザイン抗体をデザインし、これを直接評価してもよい。しかし、実際には、重要なFR残基の同定には実験を伴う場合があり、従来の1次デザイン抗体を試験的に作成してから2次デザイン抗体を作製することが望ましい。

#### 【0032】

具体的には、本発明の一つの態様として、マウス抗HM1.24抗体 (Goto, T. et al., Blood (1994) 84, 1922-1930) を鑄型として本発明の天然ヒト型化抗体を製造した。

前述のようにデザインされた天然ヒト型化抗体は、公知の方法によりそれをコードする遺伝子を得ることができる。例えばデザインされた天然ヒト型化抗体のアミノ酸配列をコードするDNAに対応する、各々重複する末端を有するような数本のオリゴヌクレオチドを合成する。これらのオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて、PCR法を行う。次いで、デザインされた天然ヒト型化抗体のアミノ酸配列をコードするDNAの両端を規定するプライマーを用いてPCR法を行うことにより、所望の天然ヒト型化抗体をコードする遺伝子を得ることができる。

#### 【0033】

前記のように構築した天然ヒト型化抗体をコードする遺伝子は、公知の方法により発現させ、天然ヒト型化抗体を取得することができる。哺乳類細胞を使用する場合、常用される有用なプロモーター/エンハンサー、発現される抗体遺伝子、その3'側下流にポリAシグナルを機能的に結合させたDNAあるいはそれを含むベクターにより発現させることができる。例えばプロモーター/エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウイルス前期プロモーター/エンハンサー (human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer) を挙げることができる。

#### 【0034】

また、その他に本発明の抗体発現に使用できるプロモーター/エンハンサーとして、レトロウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、シミアンウイルス40 (SV 40) 等のウイルスプロモーター/エンハンサーやヒトエロンゲーショ

ンファクター-1  $\alpha$  (HEF1 $\alpha$ ) などの哺乳類細胞由来のプロモーター／エンハンサーを用いればよい。

例えば、SV 40 プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mulliganらの方法 (Nature (1979) 277, 108)、また、HEF1 $\alpha$  プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mizushima らの方法 (Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) に従えば容易に実施することができる。

#### 【0035】

大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のためのシグナル配列、発現させる抗体遺伝子を機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーターとしては、lacZプロモーター、araBプロモーターを挙げることができる。lacZプロモーターを使用する場合、Wardらの方法 (Nature (1988) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427)、araBプロモーターを使用する場合、Betterらの方法 (Science (1988) 240, 1041-1043) に従えばよい。

抗体分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列 (Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379) を使用すればよい。ペリプラズムに産生された抗体を分離した後、抗体の構造を適切にリフォールド (refold) して使用する (例えば、国際特許出願公開番号 W096-30394、日本特許出願公告特公平7-93879 を参照)。

#### 【0036】

複製起源としては、SV 40、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス (BPV) 等の由来のものを用いることができる。さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

本発明の天然ヒト型化抗体の製造のために、任意の産生系を使用することができる。抗体製造のための産生系は、in vitroおよびin vivoの産生系がある。in vitroの産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

【0037】

真核細胞を使用する場合、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を用いる産生系がある。動物細胞としては、(1) 哺乳類細胞、例えばCHO (J. Exp. Med. (1995) 108, 945)、COS、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Vero、(2) 両生類細胞、例えばアフリカツメガエル卵母細胞 (Valle, et al., Nature (1981) 291, 358-340)、あるいは(3) 昆虫細胞、例えばsf9、sf21、Tn5 が知られている。CHO 細胞としては、特にDHFR遺伝子を欠損したCHO 細胞であるdhfr-CHO (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220) やCHO K-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1968) 60, 1275) を好適に使用することができる。

【0038】

植物細胞としては、*Nicotiana tabacum* 由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えばサッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、例えばサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、糸状菌、例えばアスペルギウス属 (*Aspergillus*) 属、例えばアスペルギウス・ニガー (*Aspergillus niger*) などが知られている。

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (*E. coli*)、枯草菌が知られている

【0039】

これらの細胞を、本発明の天然ヒト型化抗体をコードする遺伝子により形質転換し、形質転換された細胞をin vitroで培養することにより天然ヒト型化抗体が得られる。培養は、公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができる。その際、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできるし、無血清培養してもよい。また、抗体遺伝子を導入した細胞を動物の腹腔等へ移すことにより、in vivo にて抗体を産生してもよい。

【0040】

一方、in vivo の産生系としては、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。これらの動物または植物に抗体遺伝子を導入し、動物または植物の体内で抗体を産生させ、回収する。

動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系がある。

哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシを用いることができる (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993)。また、哺乳類動物を用いる場合、トランスジェニック動物を用いることができる。

【0041】

例えば、抗体遺伝子をヤギ $\beta$ カゼインのような乳汁中に固有に産生される蛋白質をコードする遺伝子の途中に挿入して融合遺伝子として調製する。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ導入する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギまたはその子孫が産生する乳汁から本発明の抗体を得る。トランスジェニックヤギから産生される本発明の抗体を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい。(Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。

【0042】

また、昆虫としては、例えばカイコを用いることができる。カイコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を挿入したバキュロウィルスをカイコに感染させ、このカイコの体液より所望の抗体を得る (Susumu, M. et al., Nature (1985) 315, 592-594)。

さらに植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。タバコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を植物発現用ベクター、例えばpMON 530に挿入し、このベクターをAgrobacterium tumefaciensのようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えばNicotiana tabacumに感染させ、本タバコの葉より所望の抗体を得る (Julian, K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138)。

【0043】

上述のように本発明において「宿主」とは所望の天然ヒト型化抗体を産生する動物及び植物も包含する。in vitroまたはin vivoの産生系にて抗体を産生する場合、抗体のH鎖またはL鎖をコードするDNAを別々に発現ベクターに組み込んで宿主を同時形質転換させてもよいし、あるいはH鎖およびL鎖をコードするDN

A を単一の発現ベクターに組み込んで、宿主を形質転換させてもよい（国際特許出願公開番号W0 94-11523 参照）。

宿主への発現ベクターの導入方法としては、公知の方法、例えばリン酸カルシウム法（Virology (1973) 52, 456-467）やエレクトロポレーション法（EMBO J. (1982) 1, 841-845）等が用いられる。

【0044】

前記のように産生、発現された本発明の天然ヒト型化抗体は、細胞内外、宿主から分離し均一にまで精製することができる。本発明の天然ヒト型化抗体の分離、精製は、通常の蛋白質の精製で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、アフィニティークロマトグラフィー等のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせれば分離、精製することができる（Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988）。

【0045】

アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、例えばプロテインA カラム、プロテインG カラムが挙げられる。プロテインA カラムに用いる担体として、例えばHyper D、POROS、Sephacrose F.F. (Pharmacia)等が挙げられる。

アフィニティークロマトグラフィー以外のクロマトグラフィーとしては、例えばイオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる（Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996）。

【0046】

これらのクロマトグラフィーは、液相クロマトグラフィー、例えばHPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。

得られた本発明の天然ヒト型化抗体の濃度測定は、吸光度の測定または酵素結合免疫吸着検定法（enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA）等により行う



ことができる。すなわち、吸光度の測定による場合には、得られた天然ヒト型化抗体をPBSで適当に希釈した後、280 nmの吸光度を測定する。例えば、1 mg/ml を1.35 ODとして算出すればよい。

【0047】

また、ELISAによる場合は以下のように測定することができる。すなわち、0.1M 重炭酸緩衝液 (pH9.6) で1 mg/mlに希釈したヤギ抗ヒトIgG抗体 (TAGO製) 100 ml を96穴プレート (Nunc製) に加え、4℃で一晩インキュベートし、抗体を固相化する。ブロッキングの後、適宜希釈した本発明の天然ヒト型化抗体または該抗体を含むサンプル、あるいは濃度標準品として既知の濃度のヒトIgG (CAPPEL製) 100 ml を添加し、室温にて1時間インキュベートする。

洗浄後、5000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ヒトIgG (BIO SOURCE製) 100 ml を加え、室温にて1時間インキュベートする。洗浄後、基質溶液を加えインキュベートの後、MICROPLATE READER Model 3550 (Bio-Rad 製) を用いて405nmでの吸光度を測定し、本発明の抗体の濃度を算出する。また、抗体の濃度測定には、BIAcore (Pharmacia 製) を使用することができる。

【0048】

本発明の天然ヒト型化抗体の抗原結合活性、結合阻害活性、中和活性の評価は、通常知られた方法を使用することができる。例えば本発明の天然ヒト型化抗体の活性を測定する方法として、ELISA、EIA (酵素免疫測定法)、RIA (放射免疫測定法) あるいは蛍光抗体法を用いることができる。上記抗体の活性評価には、BIAcore (Pharmacia 製) を使用することができる。

本発明の天然ヒト型化抗体は、抗体断片や抗体修飾物であってよい。例えば、抗体断片としては、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、FvまたはシングルチェーンFv (scFv) が挙げられる。scFvはH鎖とL鎖のFvを適当なリンカーで連結させた構造を有する。

【0049】

これらの抗体断片を得るためには、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、または、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる (例えば、Co, M.S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976, Better, M. & H

owitz, A. H. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Academic Press, Inc.、Plueckthun, A. & Skerra, A. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Academic Press, Inc.、Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1989) 121, 652-663、Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology (1989) 121, 663-669、Bird, R. E. et al., TIBTECH (1991) 9, 132-137 参照)。

【0050】

scFvは、抗体のH鎖V領域とL鎖V領域を連結することにより得られる(国際特許出願公開番号WO 88-09344 参照)。このscFvにおいて、H鎖V領域とL鎖V領域はリンカー、好ましくは、ペプチドリッカーを介して連結される(Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883)。scFvにおけるH鎖V領域およびL鎖V領域は、上記抗体として記載されたもののいずれの由来であってもよい。V領域を連結するペプチドリッカーとしては、例えばアミノ酸12-19残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる(米国特許US 525491参照)。

【0051】

scFvをコードするDNAは、前記抗体のH鎖または、H鎖V領域をコードするDNA、およびL鎖または、L鎖V領域をコードするDNAを鋳型とし、それらの配列のうちの所望のアミノ酸配列をコードするDNA部分を、その両端を規定するプライマー対を用いてPCR法により増幅し、次いで、さらにペプチドリッカー部分をコードするDNAおよびその両端を各々H鎖、L鎖と連結されるように規定するプライマー対を組み合わせて増幅することにより得られる。

また、一旦scFvをコードするDNAが作製されれば、それらを含む発現ベクター、および該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ることができる。また、その宿主を用いて常法に従って、scFvを得ることができる。

【0052】

これら抗体断片は、前述のようにその遺伝子を取得し発現させ、宿主により産生させることができる。本願特許請求の範囲でいう「抗体」にはこれらの抗体断片も包含される。

抗体修飾物として、ポリエチレングリコール(PEG)等の各種分子と結合した

抗体を使用することもできる。本願特許請求の範囲でいう「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野においてすでに確立されている。

#### 【0053】

本発明の天然ヒト型化抗体は、経口的あるいは非経口的に全身あるいは局所的に投与することができる。非経口的投与投与としては、例えば、点滴などの静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射、経肺投与を選択することができ、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。

本発明の天然ヒト型化抗体は、病気に既に悩まされる患者に、病気の症状を治癒するか、あるいは少なくとも部分的に阻止するために十分な量で投与される。例えば、有効投与量は、一回につき体重1 kgあたり0.01 mg から100 mgの範囲で選ばれる。あるいは、患者あたり1-1000 mg、好ましくは5-50 mgの投与量を選ぶことができる。しかしながら、本発明の天然ヒト型化抗体はこれらの投与量に制限されるものではない。また、投与期間は、患者の年齢、症状により適宜選択することができる。

#### 【0054】

本発明の天然ヒト型化抗体は、投与経路次第で医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。このような担体および添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶媒、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサントガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、ジグリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン（HSA）、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤などが挙げられる。使用される添加物は、剤型に応じて上記の中から適宜あるいは組合せて選択されるが、これらに限定されるものではない。

【0055】

<参考例>

次に、本発明を実施例により具体的に説明するに先立ち、その前提となる参考例を記載する。

参考例 1. マウス抗HM1.24抗体可変領域をコードするcDNAのクローニング

1. メッセンジャーRNA (mRNA) の単離

マウス抗HM1.24抗体を産生する  $2 \times 10^8$  個のハイブリドーマ細胞 (FERM BP-5233) からFast Track mRNA Isolation Kit Version 3.2 (Invitrogen社製) を用いてキット添付の指示書に従い、mRNAの単離を行った。

【0056】

2. 抗体可変領域をコードする遺伝子のPCR 法による増幅

Thermal Cycler (Perkin Elmer Cetus社製) を用いてPCR を行った。

2-1. マウスL 鎖V 領域をコードする遺伝子の増幅および断片化

単離したmRNAよりAMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (Life Science社製) を用いて一本鎖cDNAを合成し、PCR に用いた。また、PCR 法に使用するプライマーは、マウスカッパ型L 鎖リーダー配列とハイブリダイズする配列番号：29～39に示すMKV (Mouse Kappa Variable) プライマー (Jones, S. T. ら、Bio/Technology, 9, 88-89, (1991)) を用いた。

【0057】

PCR 溶液100  $\mu$ l は、10 mM Tris-HCl (pH8.3)、50 mM KCl、0.1 mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1.5 mM  $MgCl_2$ 、5ユニットのDNA ポリメラーゼAmpl i Taq (Perkin Elmer Cetus社製)、0.25 mM の配列番号：29～39に示すMKV プライマーと3 mMの配列番号：40に示すMKC プライマーおよび一本鎖cDNA 100 ng を含有し、これを50  $\mu$ l の鉱油で覆った後、94℃の初期温度にて3分間そして次に94℃にて1分間、55℃にて1分間および72℃にて1分間、この順序で加熱した。この温度サイクルを30回反復した後、反応混合物をさらに72℃にて10分間インキュベートした。増幅したDNA 断片を低融点アガロース (Sigma 社製) にて精製し、XmaI (New England Biolabs 社製) およびSalI (宝酒造製) により37℃にて消化した。

【0058】

## 2-2. マウスH 鎖V 領域をコードするcDNAの増幅および断片化

マウスH 鎖V 領域をコードする遺伝子は5'-RACE 法 (Rapid Amplification of cDNA ends; Frohman, M.A. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998-9002, (1988)、Edwards, J.B.D.M., ら、Nucleic Acids Res., 19, 5227-5232, (1991) ) により増幅した。マウスIgG2a 定常領域に特異的にハイブリダイズするプライマーP1 (配列番号: 41) を用いてcDNAを合成した後、5'-AmpliFINDER RACE KIT (CLONETECH 社製) を用いてマウスH 鎖V 領域をコードするcDNAの増幅をマウスIgG2a 定常領域に特異的にハイブリダイズするプライマーMHC2a (配列番号: 42) およびキット添付のアンカープライマー (配列番号: 77) を用いて行った。増幅したDNA 断片を低融点アガロース (Sigma 社製) にて精製し、そしてEcoRI (宝酒造社製) およびXmaI (New England Biolabs 社製) により37℃にて消化した。

【0059】

## 3. 連結および形質転換

上記のようにして調製したマウスカッパ型L 鎖V 領域をコードする遺伝子を含んで成るDNA 断片を、SalIおよびXmaIで消化することにより調製したpUC19 ベクターと、50 mM Tris-HCl (pH7.6)、10 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM ジチオスレイトール、1 mM ATP、50 mg/mlのポリエチレングリコール (8000) および1 ユニットT4 DNA リガーゼ (GIBCO-BRL 社製) を含有する反応混合物中で、16℃にて2.5 時間反応させ連結した。同様にマウスH 鎖V 領域をコードする遺伝子を含んで成るDNA 断片を、EcoRI およびXmaIで消化することにより調製したpUC19 ベクターと16℃にて3 時間反応させ連結した。

【0060】

次に、10  $\mu$ l の上記連結混合物を大腸菌DH5  $\alpha$  のコンピテント細胞50  $\mu$ l に加え、そしてこの細胞を氷上で30分間、42℃にて1分間そして再び氷上で1分間静置した。次いで400  $\mu$ l の2xYT培地 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook ら、Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989) ) を加え、37℃にて1時間インキュベートした後、50  $\mu$ g/ml のアンピシリンを含有する2xYT

寒天培地 (Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Sambrook ら、Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989) ) 上にこの大腸菌をまき、37℃にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。

## 【0061】

この形質転換体を、50  $\mu$ g/mlのアンピシリンを含有する2xYT培地10 ml 中で37℃にて一夜培養し、そしてこの培養物から、アルカリ法 (Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Sambrook ら、Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989) ) に従ってプラスミドDNA を調製した。

こうして得られた、抗HM1.24抗体を産生するハイブリドーマに由来するマウスカップ型L 鎖V 領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドをpUCHMVL9と命名した。上記の方法に従って得られた、抗HM1.24抗体を産生するハイブリドーマに由来するマウスH 鎖V 領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドをpUCHMVHR16と命名した。

## 【0062】

参考例 2. DNA の塩基配列の決定

前記のプラスミド中のcDNAコード領域の塩基配列を、自動DNA シークエンサー (Applied Biosystem Inc.製) およびTaq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem Inc. 製) を用いて、メーカー指定のプロトコールに従って塩基配列を決定した。

プラスミドpUCHMVL9に含まれるマウス抗HM1.24抗体のL 鎖V 領域をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号：1に示す。また、プラスミドpUCHMVHR16に含まれるマウス抗HM1.24抗体H 鎖V 領域をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号：2に示す。

## 【0063】

参考例 3. CDRの決定

L 鎖およびH 鎖のV 領域の全般的構造は、互いに類似性を有しており、それぞれ4つのフレームワーク部分が3つの超可変領域、すなわち相補性決定領域 (CDR) により連結されている。フレームワークのアミノ酸配列は、比較的良く保存されているが、一方CDR 領域のアミノ酸配列の変異性は極めて高い (Kabat, E.A

., ら, 「Sequences of Proteins of Immunological Interest」 US Dept. Health and Human Services, 1983)。

このような事実に基づき、抗HM1.24抗体の可変領域のアミノ酸配列をKabat により作製された抗体のアミノ酸配列のデータベースに当てはめて、相同性を調べることによりCDR 領域を表1に示すごとく決定した。

【0064】

【表1】

表 1

プラスミド	配列番号	CDR (1)	CDR (2)	CDR (3)
pUCHMVL9	3～5	24-34	50-56	89-97
pUCHMVHR16	6～8	31-35	50-66	99-109

【0065】

参考例4. クローニングしたcDNAの発現の確認(キメラ抗HM1.24抗体の作製)

2

#### 1. 発現ベクターの作製

キメラ抗HM1.24抗体を発現するベクターを作製するため、それぞれのマウス抗HM1.24抗体L鎖およびH鎖V領域をコードするcDNAクローンpUCHMVL9およびpUCHMVHR16をPCR法により修飾した。そしてHEF発現ベクター(国際特許出願公開番号W092-19759参照)に導入した。

【0066】

L鎖V領域のための後方プライマーONS-L722S(配列番号:43)およびH鎖V領域のための後方プライマーVHR16S(配列番号:44)は、各々のV領域のリーダー配列の最初をコードするDNAにハイブリダイズし且つKozakコンセンサス配列(Kozak, M, ら, J. Mol. Biol., 196, 947-950, (1987))およびHindIII制限酵素認識部位を有するように設計した。L鎖V領域のための前方プライマーVL9A(配列番号:45)およびH鎖V領域のための前方プライマーVHR16A(配列番号:46)は、J領域の末端をコードするDNA配列にハイブリダイズし且つスプライス

ドナー配列およびBamHI 制限酵素認識部位を有するように設計した。

【0067】

10 mM Tris-HCl (pH8.3)、50 mM KCl、0.1 mM dNTPs、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、100 pmole ずつの各プライマー、100 ngの鋳型DNA (pUCHMVL9又はpUCHMVHR16)、および5 unitのAmpli Taq 酵素を含有する100  $\mu$ l のPCR 反応混合物を50  $\mu$ l の鉱油で覆い、94℃にて最初の変性の後、94℃にて1分間、55℃にて1分間、72℃にて1分間のサイクルを30回行い、最後に72℃にて10分間インキュベートした。

PCR 生成物を1.5%低融点アガロースゲルを用いて精製し、HindIII およびBamHI で消化し、そしてL 鎖V 領域についてはHEF-VL-g $\kappa$ に、H 鎖V 領域についてはHEF-VH-g $\gamma$ 1 にそれぞれクローニングした。DNA 配列決定の後、正しいDNA 配列を有するDNA 断片を含むプラスミドをそれぞれHEF-1.24L-g $\kappa$ 及びHEF-1.24H-g $\gamma$ 1 と命名した。

【0068】

前記プラスミドHEF-1.24L-g $\kappa$ 及びHEF-1.24H-g $\gamma$ 1 からそれぞれの可変領域をコードする領域を制限酵素Hind IIIおよびBamHI により制限断片とし、これらをプラスミドベクターpUC 19のHind IIIおよびBamHI 部位に挿入し、各々、pUC19-1.24L-g $\kappa$ 及びpUC19-1.24H-g $\gamma$ 1 と命名した。

なお、それぞれのプラスミドpUC19-1.24L-g $\kappa$ 又はpUC19-1.24H-g $\gamma$ 1 を含有する大腸菌は、それぞれ、Escherichia coli DH5 $\alpha$  (pUC19-1.24L-g $\kappa$ ) およびEscherichia coli DH5 $\alpha$  (pUC19-1.24H-g $\gamma$ 1) と称し、それぞれFERM BP-5646 及びFERM BP-5644として、工業技術院生命工学工業技術研究所(茨城県つくば市東1丁目1番3号)に平成8年8月29日にブダペスト条約に基づき国際寄託された。

【0069】

2. COS-7細胞へのトランスフェクション

キメラ抗HM1.24抗体の一過性発現を観察するため、前記発現ベクターをCOS-7 (ATCC CRL-1651) 細胞において試験した。HEF-1.24L-g $\kappa$ 及びHEF-1.24H-g $\gamma$ 1 をGene Pulser 装置(BioRad社製)を用いてエレクトロポレーションによりCOS-7細胞に同時形質転換した。各DNA (10  $\mu$ g) を、PBS 中 $1 \times 10^7$  細胞/ml の



0.8ml のアリコートに加え、1500V、25  $\mu$ F の容量にてパルスを与えた。

【0070】

室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、10%の $\gamma$ -グロブリンフリーウシ胎児血清を含有するDMEM培養液 (GIBCO 社製) 30 ml に加えた。CO<sub>2</sub> インキュベーター-BNA120D (TAKAI 社製) 中で72時間のインキュベーションの後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去し、これを以下の実験に用いた。

【0071】

### 3. FCM 解析

キメラ抗HM1.24抗体の抗原結合活性は、KPM2細胞を用いたFCM (フローサイトメトリー) 解析で行った。4.7  $\times 10^5$  個のKPM2細胞 (特許出願公開番号 特開平7-236475) をPBS(-) で洗浄した後、上記キメラ抗HM1.24抗体産生COS-7細胞培養液50  $\mu$ l およびFACS緩衝液 (2 %ウシ胎児血清、0.1 %アジ化ナトリウム含有PBS(-)) 50  $\mu$ l、または500  $\mu$ g/mlの精製マウス抗HM1.24抗体 5  $\mu$ l およびFACS緩衝液95  $\mu$ l を加え、氷温下1時間インキュベートした。

【0072】

コントロールとしてキメラ抗HM1.24抗体産生COS細胞培養液の代わりに2  $\mu$ g/mlのキメラSK2 (国際特許出願公開番号W094-28159) 50  $\mu$ l およびFACS緩衝液50  $\mu$ l、または精製マウス抗HM1.24抗体の代わりに500  $\mu$ g/mlの精製マウス IgG2a  $\kappa$  (UPC10) (CAPPEL社製) 5  $\mu$ l およびFACS緩衝液95  $\mu$ l を加え、同様にインキュベートした。FACS緩衝液で洗浄した後、25  $\mu$ g/mlのFITC標識ヤギ抗ヒト抗体 (GAH) (CAPPEL社製)、または10  $\mu$ g/mlのFITC標識ヤギ抗マウス抗体 (GAM) (Becton Dickinson社製) 100  $\mu$ l を加え、氷温下30分間インキュベートした。FACS緩衝液で洗浄した後、1 ml のFACS緩衝液に懸濁し、FACScan(Becton Dickinson社製) で各細胞の蛍光強度を測定した。

【0073】

図1に示す通り、キメラ抗HM1.24抗体を添加した細胞では、マウス抗HM1.24抗体を添加した場合同様、コントロールと比較して蛍光強度のピークが右側にシフトしたことから、キメラ抗HM1.24抗体がKPM2細胞と結合したことが明らかにな

った。このことより、クローニングしたcDNAはマウス抗HM1.24抗体のV領域をコードしていることが確認された。

【0074】

参考例 5. キメラ抗HM1.24抗体安定産生CHO 細胞株の樹立

1. キメラH 鎖発現ベクターの作製

前記プラスミドHEF-1.24H-g $\gamma$ 1 を制限酵素PvuIおよびBamHI にて消化し、EF1 プロモーターおよびマウス抗HM1.24抗体H 鎖V 領域をコードするDNA を含む約2.8kbpの断片を1.5%低融点アガロースゲルを用いて精製した。次に、DHFR遺伝子およびヒトH 鎖定常領域をコードする遺伝子を含むヒトH 鎖発現ベクターDHFR- $\Delta$ E-RVh-PM1f (国際特許出願公開番号W092/19759参照) に使用されている発現ベクターをPvuIおよびBamHI にて消化することにより調製した約6kbpの断片内に上記DNA 断片を挿入し、キメラ抗HM1.24抗体H 鎖発現ベクター DHFR- $\Delta$ E-HEF-1.24H-g $\gamma$ 1 を構築した。

【0075】

2. CHO細胞への遺伝子導入

キメラ抗HM1.24抗体安定産生系を樹立するために、PvuIで消化して直鎖状にした前記発現ベクターHEF-1.24L-g $\kappa$ および DHFR- $\Delta$ E-HEF-1.24H-g $\gamma$ 1 をエレクトロポレーション法により前述と同様 (前記COS-7 細胞へのトランスフェクション) の条件下で同時にCHO 細胞DXB11 (Medical Research Council Collaboration Center より供与) に遺伝子導入した。

【0076】

3. MTXによる遺伝子増幅

遺伝子導入したCHO 細胞は500  $\mu$ g/mlのG418 (GIBCO-BRL 社製) および10% のウシ胎児血清を添加したヌクレオシド不含 $\alpha$ -MEM培養液 (GIBCO-BRL 社製) 中ではL 鎖およびH 鎖発現ベクターが共に導入されたCHO 細胞のみが生存でき、それらを選別した。次に、上記培養液中に10 nM のMTX (Sigma 社製) を加え、増殖したクローンの内、キメラ抗HM1.24抗体の産生量が高いものを選択した結果、約20  $\mu$ g/mlのキメラ抗体産生効率を示すクローン#8-13 を得、キメラ抗HM1.24抗体産生細胞株とした。

## 【0077】

参考例 6. キメラ抗HM1.24抗体の作製

キメラ抗HM1.24抗体の作製は以下の方法で行った。上記キメラ抗HM1.24抗体産生CHO細胞を、培地として5%γ-グロブリンフリー新生仔ウシ血清（GIBCO-BRL社製）含有 Iscove's Modified Dulbecco's Medium（GIBCO-BRL 社製）を用い、高密度細胞培養装置Verax system 20（CELLEX BIOSCIENCE Inc.社製）で30日間連続培養した。

## 【0078】

培養開始後13、20、23、26及び30日目に培養液を回収し、加圧式ろ過フィルターユニットSARTOBRAN（Sartorius 社製）を用いてろ過した後、抗体大量分取システムAfi-Prep System（日本ガイシ社製）およびSuper Protein A column（bed volume：100 ml、日本ガイシ社製）を用いて、付属の説明書に基づき吸着/洗浄緩衝液としてPBS(-)、溶出緩衝液として0.1M クエン酸ナトリウム緩衝液（pH3）を用いてキメラ抗HM1.24抗体をアフィニティー精製した。溶出面分は直ちに1M Tris-HCl（pH8.0）を添加して、pH7.4 付近に調整した。抗体濃度は、280nmの吸光度を測定し、1mg/ml を1.350Dとして算出した。

## 【0079】

参考例 7. キメラ抗HM1.24抗体の活性測定

キメラ抗HM1.24抗体は下記の結合阻害活性にて評価を行った。

## 1. 結合阻害活性の測定

## 1-1. ビオチン標識抗HM1.24抗体の作製

マウス抗HM1.24 抗体を0.1 M 重炭酸緩衝液で4 mg/ml に希釈した後、50 mg/mlのBiotin-N- hydroxy succinimide(EY LABS Inc.社製) 4 μl を添加し、室温で3時間反応させた。その後、0.2 M グリシン溶液1.5 mlを加え室温で30分間インキュベートし反応を停止させ、PD-10 カラム（Pharmacia Biotech 社製）を用いてビオチン化IgG 画分を分取した。

## 【0080】

## 1-2. 結合阻害活性の測定

ビオチン標識マウス抗HM1.24抗体による結合阻害活性は、ヒト羊膜細胞株WISH

細胞 (ATCC CCL 25) を用いたCell-ELISAで行った。Cell-ELISA プレートは次のようにして調製した。96穴プレートに10%ウシ胎児血清を含有するRPMI1640培地により $4 \times 10^5$  細胞/ml に調製したWISH細胞懸濁液100  $\mu$ l を加え、一晚培養した後、PBS(-)で2回洗浄後0.1 %グルタルアルデヒド (ナカライテスク社製) にて固定した。

## 【0081】

ブロッキングの後、アフィニティー精製により得られたキメラ抗HM1.24抗体あるいはマウス抗HM1.24抗体を段階希釈して各穴に50  $\mu$ l 加え、同時に2  $\mu$ g/mlのビオチン標識マウス抗HM1.24抗体50  $\mu$ l を添加し、室温にて2時間インキュベーションおよび洗浄の後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (DAKO社製) を加えた。室温にて1時間インキュベーションした後洗浄し、基質溶液を加えインキュベーションの後、6N 硫酸50  $\mu$ l で反応を停止させ、MICROPLATE READER Model 3550 (Bio-Rad 社製) を用いて490 nmでの吸光度を測定した。

その結果、図2に示す通り、ビオチン標識マウス抗HM1.24抗体に対してキメラ抗HM1.24抗体はマウス抗HM1.24抗体と同等の結合阻害活性を示した。このことより、キメラ抗体はマウス抗HM1.24抗体と同じV 領域を有することが示された。

## 【0082】

参考例 8. キメラ抗HM1.24抗体のADCC活性の測定

ADCC (Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity) 活性の測定はCurrent protocols in Immunology, Chapter 7. Immunologic studies in humans, Editor, John E. Coligan et al., John Wiley & Sons, Inc., 1993の方法に従った。

## 1. エフェクター細胞の調製

健常人および多発性骨髄腫患者の末梢血および骨髄より比重遠心法で単核球を分離した。すなわち健常人および多発性骨髄腫患者の末梢血および骨髄に等量のPBS(-)を加え、Ficoll (Pharmacia 社製) - Conrey (第一製薬社製) (比重1.077) に積層し、400 g で30分間遠心した。単核球層を分取し、10% ウシ胎児血清 (Witaker 社製) を含むRPMI1640 (Sigma 社製) で2回洗浄後、同培養液で細胞数が $5 \times 10^6$ /mlになるように調製した。

## 【0083】

## 2. 標的細胞の調製

ヒト骨髓腫細胞株RPMI 8226 (ATCC CCL 155)を0.1mCiの $^{51}\text{Cr}$ -sodium chromateとともに10% ウシ胎児血清 (Witaker 社製) を含むRPMI1640 (Sigma 社製) 中で37℃にて60分インキュベートすることにより放射性標識した。放射性標識の後、細胞をHanks balanced salt solution (HBSS) で3回洗浄し、 $2 \times 10^5/\text{ml}$ に調製した。

【0084】

## 3. ADCCアッセイ

96ウェルU 底プレート (Corning 社製) に放射性標識した $2 \times 10^5/\text{ml}$ の標的細胞を50  $\mu\text{l}$  と、アフィニティー精製によって得られた1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ のキメラ抗HM1.24抗体、マウス抗HM1.24抗体、あるいはコントロールヒトIgG1 (Serotec 社製) 50  $\mu\text{l}$  加え、4℃で15分間反応させた。

その後、 $5 \times 10^6/\text{ml}$ のエフェクター細胞を100  $\mu\text{l}$  を加え、炭酸ガス培養器内で4時間培養した。その際、エフェクター細胞 (E) と標的細胞 (T) の比 (E:T) を 0:1、5:1、20:1又は50:1とした。

【0085】

100  $\mu\text{l}$  の上清をとり、ガンマカウンター (ARC361, Aloka 社製) で培養上清中に遊離された放射活性を測定した。最大遊離放射能測定用には1%NP-40 (BR L 社製) を用いた。細胞障害活性 (%) は  $(A-C) / (B-C) \times 100$  で計算した。なおAは抗体存在下において遊離された放射活性 (cpm)、BはNP-40により遊離された放射活性 (cpm) およびCは抗体を含まず培養液のみで遊離された放射活性 (cpm) を示す。

【0086】

図3に示す通り、ヒトコントロールIgG1と比較してキメラ抗HM1.24抗体を添加した場合、E:T比の上昇に従い細胞障害活性が上昇したことから、このキメラ抗HM1.24抗体がADCC活性を有することが示された。さらに、マウス抗HM1.24抗体を添加しても細胞障害活性は全く見られないことから、エフェクター細胞がヒト由来の細胞の場合、ADCC活性を得るためにはヒト抗体のFc部分が必要であることが示された。

【0087】

参考例 9. 再構成ヒト抗HM1.24抗体の作製

1. 再構成ヒト抗HM1.24抗体V領域の設計

マウスモノクローナル抗体のCDR がヒト抗体に移植されている再構成ヒト抗体を作製するためには、マウスモノクローナル抗体のFRとヒト抗体のFRとの間に高い相同性が存在することが望ましい。従って、マウス抗HM1.24抗体のL鎖及びH鎖のV領域を、Protein Data Bank を用いて構造が解明されているすべての既知抗体のV領域と比較した。

【0088】

マウス抗HM1.24抗体のL鎖V領域はヒトL鎖V領域のサブグループIV (HSGI V) のコンセンサス配列に最も類似しており、66.4%の相同性が存在する。一方、HSGI、HSGII 及びHSG III とはそれぞれ56.9%、55.8%及び61.5%の相同性を示した。

マウス抗HM1.24抗体のL鎖V領域は既知ヒト抗体L鎖V領域との比較において、ヒトL鎖V領域のサブグループIの一つであるヒトL鎖V領域REI に67.0%の相同性を示した。従って、再構成ヒト抗HM1.24抗体L鎖V領域の作製のための出発材料としてREI のFRを使用した。

【0089】

再構成ヒト抗HM1.24抗体L鎖V領域のバージョンaを設計した。このバージョンにおいては、ヒトFRは再構成ヒトCAMPATH-1H抗体中に存在するREI に基くFR (Riechmann, L. ら、Nature 322, 21-25, (1988) を参照、国際特許出願公開番号W092-19759に記載の再構成ヒトPM-1のL鎖V領域のバージョンaに含まれるFR) と同一であり、そしてマウスCDR はマウス抗HM1.24抗体のL鎖V領域中のCDR と同一とした。

【0090】

マウス抗HM1.24抗体のH鎖V領域はヒトH鎖V領域のHSG I のコンセンサス配列に最も類似しており、54.7%の相同性が存在する。一方、HSGII 及びHSGIII とはそれぞれ34.6%及び48.1%の相同性を示した。マウス抗HM1.24抗体のH鎖V領域は既知のヒト抗体H鎖V領域との比較において、FR1 からFR3 までは、ヒ

トH鎖V領域のサブグループIの一つであるヒト抗体HG3のH鎖V領域 (Rechavi, G. ら、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 80, 855-859) に非常に類似しており、その相同性は67.3%であった。

【0091】

このため、ヒト抗体HG3のFRを、再構成ヒト抗HM1.24抗体のH鎖V領域の作製のための出発材料として用いた。しかしながら、ヒト抗体HG3のFR4のアミノ酸配列は記述されていないために、今回FR4に関してはマウス抗HM1.24抗体のH鎖のFR4と最も高い相同性を示すヒト抗体JH6 (Ravetch, J. V. ら、Cell, 27, 583-591) のFR4のアミノ酸配列を用いた。JH6のFR4は一つのアミノ酸を除いてマウス抗HM1.24抗体のH鎖のFR4と同一のアミノ酸配列を有する。

再構成ヒト抗HM1.24抗体のH鎖V領域の第一のバージョンaにおいて、ヒトFR1中の30位およびヒトFR3中の71位のアミノ酸をマウス抗HM1.24抗体のアミノ酸と同一とした以外、FR1からFR3まではヒトHG3のFR1からFR3と同一であり、そしてCDRはマウス抗HM1.24抗体のH鎖V領域中のCDRと同一とした。

【0092】

2. 再構成ヒト抗HM1.24抗体L鎖V領域の作製

再構成ヒト抗HM1.24抗体L鎖を、PCR法によるCDRグラフトイングにより作製した。この方法を図4に模式的に示す。ヒト抗体REI由来のFRを有する再構成ヒト抗HM1.24抗体(バージョンa)の作製のために8個のPCRプライマーを使用した。外部プライマーA(配列番号:47)及びH(配列番号:48)は、HEF発現ベクターHEF-VL-gκのDNA配列とハイブリダイズするように設計された。

CDR-グラフトイングプライマーL1S(配列番号:49)、L2S(配列番号:50)及びL3S(配列番号:51)はセンスDNA配列を有し、そしてCDR-グラフトイングプライマーL1A(配列番号:52)、L2A(配列番号:53)及びL3A(配列番号:54)はアンチセンスDNA配列を有しそしてそれぞれプライマーL1S、L2S及びL3Sの5'-末端のDNA配列に対する相補的DNA配列(20~23bp)を有する。

【0093】

第一PCR段階において4つの反応A-L1A、L1S-L2A、L2S-L3A、及びL3S-Hを

行い、そして各PCR 生成物を精製した。第一PCR からの4つのPCR 生成物をそれら自体の相補性によりアッセンブリさせた（国際特許出願公開番号W092-19759参照）。次に、外部プライマーA及びHを加えて、再構成ヒト抗HM1.24抗体L鎖V領域をコードする全長DNAを増幅した（第2PCR）。前記PCRにおいては、ヒト抗体REIからのFRに基く再構成ヒトONS-M21 抗体L鎖V領域バージョンaをコードするプラスミドHEF-RVL-M21a（国際特許出願公開番号W095-14041を参照）を鋳型として用いた。

## 【0094】

第一PCR 段階においては、10 mM Tri-HCl（pH8.3）、50 mM KCl、0.1mM dNTPs、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、100 ngの鋳型DNA、100 pmoleの各プライマー及び5 uのAmpli Taqを含有するPCR 混合物を用いた。各PCR チューブは50  $\mu$ lの鉱油で覆膜した。最初に94℃で変性した後、94℃にて1分間、55℃にて1分間及び72℃にて1分間の反応サイクルを行い、次に72℃にて10分間インキュベートした。

## 【0095】

PCR 生成物A-L1A（215bp）、L1S-L2A（98bp）、L2S-L3A（140bp）及びL3S-H（151bp）を1.5 %低融点アガロースゲルを用いて精製し、第二PCR でアッセンブリした。第二PCR においては、1  $\mu$ gの各第一PCRの生成物、及び5 uのAmpli Taqを含有する98  $\mu$ lのPCR 混合物を、94℃にて2分間、55℃にて2分間及び72℃にて2分間で2サイクルインキュベートし、そして次に100 pmoleの各外部プライマー（A及びH）を加えた。PCR チューブを50  $\mu$ lの鉱油で覆い、そして前記と同一の条件で30サイクルのPCRを行った。

## 【0096】

第二PCRにより生じた516bpのDNA断片を1.5 %低融点アガロースゲルで精製し、BamHI及びHindIIIで消化し、得られたDNA断片をHEF発現ベクターHEF-VL-g $\kappa$ にクローニングした。DNA配列決定の後、再構成ヒト抗HM1.24抗体L鎖V領域の正しいアミノ酸配列をコードするDNA断片を含むプラスミドをHEF-RVL $\alpha$ -AHM-g $\kappa$ と命名した。本プラスミドHEF-RVL $\alpha$ -AHM-g $\kappa$ に含まれるL鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号：9に示す。

再構成ヒト抗HM1.24抗体L鎖V領域のバージョンbを、PCRを用いる変異誘発



法によって作製した。変異原プライマーFTY-1（配列番号：55）およびFTY-2（配列番号：56）は、71位のフェニルアラニンがチロシンに変異するように設計した。

#### 【0097】

プラスミドHEF-RVLa-AHM-gκを鋳型とし、上記プライマーを用いて増幅した後、最終生成物を精製し、BamHI およびHindIII で消化し、得られたDNA断片をHEF発現ベクターHEF-VL-gκにクローニングし、プラスミドHEF-RVLb-AHM-gκを得た。本プラスミドHEF-RVLb-AHM-gκに含まれるL鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号：10に示す。

#### 【0098】

### 3. 再構成ヒト抗HM1.24抗体H鎖V領域の作製

#### 3-1. 再構成ヒト抗HM1.24抗体H鎖V領域バージョンa-eの作製

再構成ヒト抗HM1.24抗体H鎖V領域をコードするDNAを次の様にして設計した。ヒト抗体HG3のFR1～3およびヒト抗体JH6のFR4をコードするDNA配列を、マウス抗HM1.24抗体H鎖V領域のCDRをコードするDNA配列とつなげることで、再構成ヒト抗HM1.24抗体H鎖V領域をコードする全長DNAを設計した。

次に、このDNA配列のそれぞれ5'側及び3'側にHindIII認識部位/Kozakコンセンサス配列及びBamHI認識部位/スプライドナー配列を付加して、HEF発現ベクターに挿入できるようにした。

#### 【0099】

こうして設計したDNA配列を4個のオリゴヌクレオチドに分け、そして次に、これらのオリゴヌクレオチドのアセンブリーを妨害する可能性のあるオリゴヌクレオチド中の二次構造についてコンピューター解析した。4個のオリゴヌクレオチド配列RVH1～RVH4を配列番号：57～60に示す。これらのオリゴヌクレオチドは119～144塩基の長さを有し、25～26bpのオーバーラップ領域を有する。オリゴヌクレオチドの内のRVH2（配列番号：58）、RVH4（配列番号：60）はセンスDNA配列を有し、そして他のRVH1（配列番号：57）、RVH3（配列番号：59）はアンチセンスDNA配列を有する。これら4個のオリゴヌクレオチドのPCR法によるアセンブリーの方法を図に示す（図5参照）。

【0100】

100 ngずつの4種のオリゴヌクレオチド及び5 uのAmpli Taq を含有する98  $\mu$  l のPCR 混合物を、94℃にて2分間の最初の変性の後、94℃にて2分間、55℃にて2分間及び72℃にて2分間のから成る2サイクルのインキュベーションを行った。100 pmole ずつのRHP1（配列番号：61）及びRHP2（配列番号：62）を外部プライマーとして添加した後、PCR チューブを50  $\mu$  l の鉱油で覆い、そして94℃にて1分間の最初の変性の後、94℃にて1分間、55℃にて1分間及び72℃にて1分間の38サイクルを行い、そして次に72℃にて10分間インキュベートした。

【0101】

438bp のDNA 断片を1.5 %低融点アガロースゲルを用いて精製し、HindIII 及びBamHI により消化し、そして次にHEF 発現ベクターHEF-VH-g $\gamma$ 1 にクローニングした。DNA 配列決定の後、正しいH鎖V領域のアミノ酸配列をコードするDNA 断片を含むプラスミドをHEF-RVHa-AHM-g $\gamma$ 1 と命名した。本プラスミドHEF-RVHa-AHM-g $\gamma$ 1 に含まれるH鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号：11に示す。

再構成ヒト抗HM1.24抗体H鎖V領域の各バージョンb、c、d及びeを以下のようにして作製した。

【0102】

バージョンbは、変異原プライマーとして66位のアルギニンがリジンに変異するように設計したBS（配列番号：63）およびBA（配列番号：64）を用い、プラスミドHEF-RVHa-AHM-g $\gamma$ 1 を鋳型DNA として、PCR 法により増幅し、プラスミドHEF-RVHb-AHM-g $\gamma$ 1 を得た。本プラスミドHEF-RVHb-AHM-g $\gamma$ 1 に含まれるH鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号：12に示す。

【0103】

バージョンcは、変異原プライマーとして73位のトレオニンがリジンに変異するように設計したCS（配列番号：65）およびCA（配列番号：66）を用い、プラスミドHEF-RVHa-AHM-g $\gamma$ 1 を鋳型DNA として、PCR 法により増幅し、プラスミドHEF-RVHc-AHM-g $\gamma$ 1 を得た。本プラスミドHEF-RVHc-AHM-g $\gamma$ 1 に含まれるH鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号：13に示す。

バージョン d は、変異原プライマーとして66位のアルギニンがリジンに、73位のトレオニンがリジンに変異するように設計したDS（配列番号：67）およびDA（配列番号：68）を用い、プラスミドHEF-RVHa-AHM-g $\gamma$ 1 を鋳型DNA としてプラスミドHEF-RVHd-AHM-g $\gamma$ 1 を得た。本プラスミドHEF-RVHd-AHM-g $\gamma$ 1 に含まれるH鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号：14に示す。

バージョン e は、変異原プライマーとして67位のバリンがアラニンに、69位のメチオニンがロイシンに変異するように設計したES（配列番号：69）およびEA（配列番号：70）を用い、プラスミドHEF-RVHa-AHM-g $\gamma$ 1 を鋳型DNA として増幅し、プラスミドHEF-RVHe-AHM-g $\gamma$ 1 を得た。本プラスミドHEF-RVHe-AHM-g $\gamma$ 1 に含まれるH鎖V領域に含まれるアミノ酸配列および塩基配列を配列番号：15に示す。

#### 【0104】

##### 3-2. H鎖ハイブリッドV領域の作製

H鎖ハイブリッドV領域を2種構築した。1つはFR1 とFR2 のアミノ酸配列がマウス抗HM1.24 抗体由来であり、FR3 とFR4 のアミノ酸配列が再構成ヒト抗HM1.24抗体のH鎖V領域のバージョン a 由来となるマウス・ヒトハイブリッド抗HM1.24抗体、もう1つはFR1 とFR2 のアミノ酸配列が再構成ヒト抗HM1.24抗体のH鎖V領域のバージョン a 由来であり、FR3 とFR4 のアミノ酸配列がマウス抗HM1.24抗体由来となるヒト・マウスハイブリッド抗HM1.24抗体である。CDR 領域のアミノ酸配列はすべてマウス抗HM1.24抗体由来である。

#### 【0105】

2種のH鎖ハイブリッドV領域はPCR 法により作製した。この方法を図6及び7に模式的に示す。2種のH鎖ハイブリッドV領域作製のために4種のプライマーを使用した。外部プライマー a（配列番号：71）及びh（配列番号：72）は、HEF 発現ベクターHEF-VH-g $\gamma$ 1 のDNA 配列とハイブリダイズするように設計された。H鎖ハイブリッド作製プライマーHYS（配列番号：73）はセンスDNA 配列を有し、H鎖ハイブリッドプライマーHYA（配列番号：74）はアンチセンスDNA 配列を有しそしてたがい相補的なDNA 配列となるよう設計された。

#### 【0106】

FR1 とFR2 のアミノ酸配列がマウス抗HM1.24抗体由来であり、FR3 とFR4 のアミノ酸配列が再構成ヒト抗HM1.24抗体のH鎖V領域のバージョンa由来となるH鎖ハイブリッドV領域の作製のために、第一PCR 段階においてプラスミド H EF-1.24H-g $\gamma$ 1 を鋳型とし外部プライマー a とH鎖ハイブリッドプライマーHYA を用いたPCR と、プラスミドHEF-RVHa-AHM-g $\gamma$ 1 を鋳型としH鎖ハイブリッドプライマーHYS (配列番号: 73) と外部プライマー h (配列番号: 72) を用いたPCR を行い、そして各PCR 産物を精製した。第一PCR からの2つのPCR 生成物をそれら自体の相補性によりアッセンブリさせた(国際特許出願公開番号W092-19759 参照)。

#### 【0107】

次に、外部プライマー a (配列番号: 71) 及び h (配列番号: 72) を加えて、FR1 とFR2 のアミノ酸配列がマウス抗HM1.24抗体由来であり、FR3 とFR4 のアミノ酸配列が再構成ヒト抗HM1.24抗体のH鎖V領域のバージョンa由来となるH鎖ハイブリッドV領域をコードする全長DNA を第二PCR 段階で増幅した。

FR1 とFR2 のアミノ酸配列が再構成ヒト抗HM1.24抗体のH鎖V領域のバージョンa由来であり、FR3 とFR4 のアミノ酸配列がマウス抗HM1.24抗体由来となるH鎖ハイブリッドV領域の作製のために、第一PCR 段階においてプラスミドHEF-RVHa-AHM-g $\gamma$ 1 を鋳型とし外部プライマー a とH鎖ハイブリッドプライマーHYA を用いたPCR と、プラスミド HEF-1.24H-g $\gamma$ 1 を鋳型としH鎖ハイブリッドプライマーHYS と外部プライマー h を用いたPCR を行い、そして各PCR 産物を精製した。第一PCR からの2つのPCR 生成物をそれら自体の相補性によりアッセンブリさせた(国際特許出願公開番号W092-19759参照)。

#### 【0108】

次に、外部プライマー a 及び h を加えて、FR1 とFR2 のアミノ酸配列が再構成ヒト抗HM1.24抗体のH鎖V領域のバージョンa由来であり、FR3 とFR4 のアミノ酸配列がマウス抗HM1.24 抗体由来となるH鎖ハイブリッドV領域をコードする全長DNA を第二PCR 段階で増幅した。

第一PCR、PCR 産物の精製、アッセンブリ、第二PCR、及びHEF 発現ベクター HEF-VH-g $\gamma$ 1 へのクローニングの方法は実施例 9. 再構成ヒトHM1.24抗体L鎖

V領域の作製に示す方法に準じた。

【0109】

DNA 配列決定の後、FR1 とFR2 のアミノ酸配列がマウス抗HM1.24抗体由来であり、FR3 とFR4 のアミノ酸配列が再構成ヒト抗HM1.24抗体のH鎖V領域のバージョンa由来となるH鎖ハイブリッドV領域の正しいアミノ酸配列をコードするDNA断片を含むプラスミドをHEF-MH-RVH-AHM-g $\gamma$ 1 と命名した。本プラスミドHEF-MH-RVH-AHM-g $\gamma$ 1 に含まれるH鎖V領域のアミノ酸配列及び塩基配列を配列番号：75に示す。また、FR1 とFR2 のアミノ酸配列が再構成ヒト抗HM1.24抗体H鎖V領域のバージョンa由来であり、FR3 とFR4 のアミノ酸配列がマウス抗体HM1.24 抗体由来となるH鎖ハイブリッドV領域の正しいアミノ酸配列をコードするDNA断片を含むプラスミドをHEF-HM-RVH-AHM-g $\gamma$ 1 と命名した。本プラスミドHEF-HM-RVH-AHM-g $\gamma$ 1 に含まれるH鎖V領域のアミノ酸配列及び塩基配列を配列番号：76に示す。

【0110】

3-3. 再構成ヒト抗HM1.24抗体H鎖V領域バージョンf～rの作製

再構成ヒト抗HM1.24抗体H鎖V領域の各バージョンf、g、h、i、j、k、l、m、n、o、p、q、rを以下のようにして作製した。

バージョンfは、変異原プライマーとして75位のトレオニンがセリンに、78位のバリンがアラニンに変異するように設計したFS（配列番号：78）およびFA（配列番号：79）を用い、プラスミドHEF-RVHe-AHM-g $\gamma$ 1 を鋳型DNAとして、PCR法により増幅し、プラスミドHEF-RVHf-AHM-g $\gamma$ 1 を得た。本プラスミドHEF-RVHf-AHM-g $\gamma$ 1 に含まれるH鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号：16に示す。

【0111】

バージョンgは、変異原プライマーとして40位のアラニンがアルギニンに変異するように設計したGS（配列番号：80）およびGA（配列番号：81）を用い、プラスミドHEF-RVHa-AHM-g $\gamma$ 1 を鋳型DNAとして増幅し、プラスミドHEF-RVHg-AHM-g $\gamma$ 1 を得た。本プラスミドHEF-RVHg-AHM-g $\gamma$ 1 に含まれるH鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号：17に示す。

バージョン h は、変異原プライマーとして FS (配列番号: 78) および FA (配列番号: 79) を用い、プラスミド HEF-RVHh-AHM-g $\gamma$ 1 を鋳型 DNA として増幅し、プラスミド HEF-RVHh-AHM-g $\gamma$ 1 を得た。本プラスミド HEF-RVHh-AHM-g $\gamma$ 1 に含まれる H鎖 V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号: 18 に示す。

## 【0112】

バージョン i は、変異原プライマーとして 83 位のアルギニンがアラニンに、84 位のセリンがフェニルアラニンに変異するように設計した IS (配列番号: 82) および IA (配列番号: 83) を用い、プラスミド HEF-RVHi-AHM-g $\gamma$ 1 を鋳型 DNA として増幅し、プラスミド HEF-RVHi-AHM-g $\gamma$ 1 を得た。本プラスミド HEF-RVHi-AHM-g $\gamma$ 1 に含まれる H鎖 V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号: 19 に示す。

バージョン j は、変異原プライマーとして 66 位のアルギニンがリジンに変異するように設計した JS (配列番号: 84) と JA (配列番号: 85) を用い、プラスミド HEF-RVHj-AHM-g $\gamma$ 1 を鋳型 DNA として増幅し、プラスミド HEF-RVHj-AHM-g $\gamma$ 1 を得た。本プラスミド HEF-RVHj-AHM-g $\gamma$ 1 に含まれる H鎖 V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号: 20 に示す。

## 【0113】

バージョン k は、変異原プライマーとして 81 位のグルタミン酸がグルタミンに変異するように設計した KS (配列番号: 86) および KA (配列番号: 87) を用い、プラスミド HEF-RVHk-AHM-g $\gamma$ 1 を鋳型 DNA として増幅し、プラスミド HEF-RVHk-AHM-g $\gamma$ 1 を得た。本プラスミド HEF-RVHk-AHM-g $\gamma$ 1 に含まれる H鎖 V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号: 21 に示す。

バージョン l は、変異原プライマーとして 81 位のグルタミン酸がグルタミンに、82B 位のセリンがイソロイシンに変異するように設計した LS (配列番号: 88) および LA (配列番号: 89) を用い、プラスミド HEF-RVHl-AHM-g $\gamma$ 1 を鋳型 DNA として増幅し、プラスミド HEF-RVHl-AHM-g $\gamma$ 1 を得た。本プラスミド HEF-RVHl-AHM-g $\gamma$ 1 に含まれる H鎖 V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号: 22 に示す。

## 【0114】

バージョン m は、変異原プライマーとして81位のグルタミン酸がグルタミンに、82b 位のセリンがイソロイシンに、87位のトレオニンがセリンに変異するように設計したMS（配列番号：90）とMA（配列番号：91）を用い、プラスミドHEF-RV Hh-AHM-g $\gamma$ 1 を鋳型DNA として増幅し、プラスミドHEF-RVHm-AHM-g $\gamma$ 1 を得た。本プラスミドHEF-RVHm-AHM-g $\gamma$ 1 に含まれるH鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号：23に示す。

バージョン n は、変異原プライマーとして82B 位のセリンがイソロイシンに変異するように設計したNS（配列番号：92）およびNA（配列番号：93）を用い、プラスミドHEF-RVHh-AHM-g $\gamma$ 1 を鋳型DNA としてプラスミドHEF-RVHn-AHM-g $\gamma$ 1 を得た。本プラスミドHEF-RVHn-AHM-g $\gamma$ 1 に含まれるH鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号：24に示す。

#### 【0115】

バージョン o は、変異原プライマーとして87位のトレオニンがセリンに変異するように設計したOS（配列番号：94）およびOA（配列番号：95）を用い、プラスミドHEF-RVHh-AHM-g $\gamma$ 1 を鋳型DNA としてプラスミドHEF-RVHo-AHM-g $\gamma$ 1 を得た。本プラスミドHEF-RVHo-AHM-g $\gamma$ 1 に含まれるH鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号：25に示す。

バージョン p は、変異原プライマーとして78位のバリンがアラニンに変異するように設計したPS（配列番号：96）およびPA（配列番号：97）を用い、プラスミドHEF-RVHa-AHM-g $\gamma$ 1 を鋳型DNA として、PCR 法により増幅し、プラスミドHEF-RVHp-AHM-g $\gamma$ 1 を得た。本プラスミドHEF-RVHp-AHM-g $\gamma$ 1 に含まれるH鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号：26に示す。

#### 【0116】

バージョン q は、変異原プライマーとして75位のトレオニンがセリンに変異するように設計したQS（配列番号：98）およびQA（配列番号：99）を用い、プラスミドHEF-RVHa-AHM-g $\gamma$ 1 を鋳型DNA として、PCR 法により増幅し、プラスミドHEF-RVHq-AHM-g $\gamma$ 1 を得た。本プラスミドHEF-RVHq-AHM-g $\gamma$ 1 に含まれるH鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号：27に示す。

バージョン r は、変異原プライマーとしてCS（配列番号：65）およびCA（配列

番号：66) を用い、プラスミドHEF-RVHp-AHM-g $\gamma$ 1 を鋳型DNA として、PCR 法により増幅し、プラスミドHEF-RVHr-AHM-g $\gamma$ 1 を得た。本プラスミドHEF-RVHr-AHM-g $\gamma$ 1 に含まれるH鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号：28に示す。

【0117】

なお、前記プラスミドHEF-RVL $\alpha$ -AHM-g $\kappa$  及びHEF-RVHr-AHM-g $\gamma$ 1 からそれぞれの可変領域をコードする領域を制限酵素HindIII およびBamHI により制限断片とし、これらをプラスミドベクターpUC19 のHindIII およびBamHI 部位に挿入した。それぞれのプラスミドはpUC19-RVL $\alpha$ -AHM-g $\kappa$  及びpUC19-RVHr-AHM-g $\gamma$ 1 と命名した。

なお、それぞれのプラスミドpUC19-RVL $\alpha$ -AHM-g $\kappa$  およびpUC19-RVHr-AHM-g $\gamma$ 1 を含有する大腸菌は、それぞれ、*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (pUC19-RVL $\alpha$ -AHM-g $\kappa$ ) および*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (pUC19-RVHr-AHM-g $\gamma$ 1) と称し、工業技術院生命工学工業技術研究所(茨城県つくば市東1丁目1番3号)に平成8年8月29日に、各々FERM BP-5645およびFERM BP-5643としてブダペスト条約に基づき国際寄託された。

【0118】

4. 再構成ヒト抗HM1.24抗体、キメラ抗HM1.24抗体、及びH鎖ハイブリッド抗体の作製

再構成ヒト抗HM1.24抗体の各鎖を評価するために再構成ヒト抗HM1.24抗体とポジティブコントロール抗体としてキメラ抗HM1.24抗体を発現させた。そして再構成ヒト抗HM1.24抗体H鎖V領域のバージョンb以降の各バージョンを作製する際、どのFR内のアミノ酸残基を置換すべきかを検討するためにH鎖ハイブリッド抗体を発現させた。また、再構成ヒト抗HM1.24抗体L鎖バージョンaの評価のためにキメラH鎖との組合せで発現させた。

【0119】

4-1. 再構成ヒト抗HM1.24抗体の発現

再構成ヒト抗HM1.24抗体H鎖のための発現ベクター (HEF-RVHa-AHM-g $\gamma$ 1 ~ HEF-RVHr-AHM-g $\gamma$ 1) と再構成ヒト抗HM1.24抗体L鎖のための発現ベクター (HEF-



RVL $\alpha$ -AHM-g $\kappa$ あるいはHEF-RVL $\beta$ -AHM-g $\kappa$ )各10 $\mu$ gをGene Pulser 装置 (BioRad 社製)を用いてエレクトロポレーションによりCOS-7細胞に同時形質転換した。各DNA (10 $\mu$ g)を、PBS 中 $1 \times 10^7$ 細胞/mlの0.8mlのアリコートに加え、1500V、25 $\mu$ Fの容量にてパルスを与えた。

#### 【0120】

室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、10%の $\gamma$ -グロブリンフリーウシ胎児血清を含有するDMEM培養液30 ml (GIBCO 社製)に加えた。37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$ の条件下で72時間の培養をCO $_2$ インキュベーターBNA120D (TAKAI 社製)を用いて行った後、培養上清を集め、遠心ローター03 (HITACHI 社製)を装着した遠心機15PR-22 (HITACHI 社製)により1000 rpm、5分間の遠心分離を行い細胞破片を除去し、マイクロコンセントレーター (Centricon 100、Amicon社製)を遠心ローターJA-20 $\cdot$ 1 (BECKMAN 社製)を装着した遠心器J2-21 (BECKMAN 社製)により2000 rpmの条件下で限外濾過濃縮をおこない、Cell-ELISAに用いた。

#### 【0121】

##### 4-2. キメラ抗HM1.24抗体の発現

キメラ抗HM1.24抗体H鎖のための発現ベクター HEF-1.24H-g $\gamma$ 1 とキメラ抗HM1.24抗体L鎖のための発現ベクター HEF-1.24L-g $\kappa$ 各10 $\mu$ gを用い、上記再構成ヒト抗HM1.24抗体の発現の方法にしたがってCell-ELISAに用いるためのキメラ抗HM1.24抗体を調製した。

##### 4-3. ヒト型化L鎖バージョンaとキメラH鎖からなる抗HM1.24抗体の発現

キメラ抗HM1.24抗体H鎖のための発現ベクターHEF-1.24H-g $\gamma$ 1と再構成ヒト抗HM1.24抗体L鎖バージョンaのための発現ベクターHEF-RVL $\alpha$ -AHM-G $\kappa$ 各10 $\mu$ gを用い、上記再構成ヒト抗HM1.24抗体の発現の方法に従って、Cell-ELISAに用いるためのヒト型化L鎖バージョンaとキメラH鎖からなる抗HM1.24抗体を調製した。

#### 【0122】

##### 4-4. H鎖ハイブリッド抗体の発現

H鎖ハイブリッドV領域のための発現ベクター (HEF-MH-RVH-AHM-g $\gamma$ 1 或いは

HEF-HM-RVH-AHM-g $\gamma$ 1) と再構成ヒト抗HM1.24抗体L鎖のための発現ベクターHEF-RVLa-AHM-g $\kappa$ 各10 $\mu$ gを用い、上記再構成ヒト抗HM1.24抗体の発現の方法にしたがってCell-ELISAに用いるためのH鎖ハイブリッド抗体を調製した。

【0123】

4-5. 抗体濃度の測定

得られた抗体の濃度測定はELISAにより行った。ELISA用96穴プレート(Maxisorp, NUNC社製)の各穴にコーティングバッファー(0.1M NaHCO<sub>3</sub>, 0.02% NaN<sub>3</sub>, pH9.6)により1 $\mu$ g/mlの濃度に調製したヤギ抗ヒトIgG抗体(BIO SOURCE社製)100 $\mu$ lを加え、室温で1時間のインキュベーションを行い固相化した。100 $\mu$ lの希釈バッファー(50mM Tris-HCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.15M NaCl, 0.05% Tween20, 0.02% NaN<sub>3</sub>, 1%牛血清アルブミン(BSA), pH8.1)でブロッキングした後、限外濾過濃縮を行った再構成ヒト抗HM1.24抗体、キメラ抗HM1.24抗体、及びH鎖ハイブリッド抗体を順次段階希釈して各穴に100 $\mu$ lずつ加え室温で1時間のインキュベーションおよび洗浄の後、アルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ヒトIgG抗体(DAKO社製)100 $\mu$ lを加えた。

【0124】

室温にて1時間のインキュベーションおよび洗浄の後、基質バッファー(50mM NaHCO<sub>3</sub>, 10mM MgCl<sub>2</sub>(pH9.8))に溶解した1mg/mlの基質溶液(Sigma104, p-ニトロフェニルリン酸, SIGMA社製)100 $\mu$ lを加え、405nmでの吸光度をMICROPLATE READER Model 3550(Bio-Rad社製)を用いて測定した。濃度測定の標品としてヒトIgG1 $\kappa$ (The Binding Site社製)を用いた。

【0125】

5. 再構成ヒト抗HM1.24抗体安定産生CHO細胞株の樹立

5-1. 再構成ヒト抗HM1.24抗体H鎖発現ベクターの作製

プラスミドHEF-RVHr-AHM-g $\gamma$ 1を制限酵素PvuI及びBamHIにて消化し、EF1プロモーター及び再構成ヒト抗HM1.24抗体H鎖V領域をコードするDNAを含む約2.8 kbpの断片を1.5%低融点アガロースゲルを用いて精製した。次に、DHFR遺伝子およびヒトH鎖定常領域をコードする遺伝子を含むヒトH鎖発現ベクターDHFR- $\Delta$ E-RVh-PM1f(国際特許出願公開番号WO92-19759)に使用されている発現

ベクターをPvuI及びBamHIにて消化することにより調製した約6 kbpの断片内に上記DNA断片を挿入し、再構成ヒト抗HM1.24抗体H鎖発現ベクターDHFR- $\Delta$ E-HEF-RVHr-AHM-g $\gamma$ 1を構築した。

【0126】

#### 5-2. CHO細胞への遺伝子導入

再構成ヒト抗HM1.24抗体安定産生系を樹立するために、PvuIで消化して直鎖状にした前記発現ベクターDHFR- $\Delta$ E-HEF-RVHr-AHM-g $\gamma$ 1及びHEF-RVL $\alpha$ -AHM-g $\kappa$ をエレクトロポレーション法により前述と同様（前記COS-7細胞へのトランスフェクション）の条件下で同時にCHO細胞DXB-11に遺伝子導入した。

【0127】

#### 5-3. MTXによる遺伝子増幅

遺伝子導入したCHO細胞は500  $\mu$ g/mlのG418（GIBCO-BRL社製）及び10%のウシ胎児血清を添加したヌクレオシド不含 $\alpha$ -MEM培養液中（GIBCO-BRL社製）ではL鎖及びH鎖発現ベクターが共に導入されたCHO細胞のみが増殖でき、それらを選別した。次に、上記培養液中に10 nMのMTX（Sigma社製）を加え、増殖したクローンのうち再構成ヒト抗HM1.24抗体の産生量が高いものを選択した結果、約3  $\mu$ g/mlの再構成ヒト抗HM1.24抗体産生率を示すクローン#1を得、再構成ヒト抗HM1.24抗体産生細胞株とした。

【0128】

#### 5-4. 再構成ヒト抗HM1.24抗体の作製

再構成ヒト抗HM1.24抗体の作製は以下の方法で行った。上記再構成ヒト抗HM1.24抗体産生CHO細胞を、培地として10%の $\gamma$ -グロブリンフリーウシ胎児血清（GIBCO-BRL社製）を含有する500  $\mu$ g/mlのG418（GIBCO-BRL社製）を添加したヌクレオシド不含 $\alpha$ -MEM培養液（GIBCO-BRL社製）を用い、37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で10日の培養をCO<sub>2</sub>インキュベーターBNA120D（TABAI社製）を用いて行った。培養開始後8、10日目に培養液を回収し、TS-9ローターを装着した遠心機RL-500SP（トミー精工社製）を用いて2000rpm、10分間の遠心分離を行い培養液中の細胞破片を除去した後、0.45  $\mu$ m径のメンブレンをもつボトルトップフィルター（FALCON社製）により濾過滅菌した。

## 【0129】

この再構成ヒト抗HM1.24抗体産生CHO細胞培養液に等量のPBS(-)を加えた後、高速抗体精製装置ConSep LC100 (MILLIPORE 社製) およびHyper D Protein A カラム (日本ガイシ社製) を用い、付属の説明書に基づき吸着緩衝液としてPBS(-)、溶出緩衝液として0.1M クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH3) を用いて再構成ヒト抗HM1.24抗体をアフィニティー精製した。溶出画分は直ちに1M Tris-HCl (pH 8.0) を添加してpH7.4 付近に調整した後、遠心限外濃縮器Centriprep 10 (MILLIPORE 社製) を用いて濃縮およびPBS(-)への緩衝液置換を行い、孔径0.22  $\mu$ m のメンブレンフィルターMILLEX-GV (MILLIPORE 社製) を用いて濾過滅菌し精製再構成ヒト抗HM1.24抗体を得た。精製抗体の濃度は、280nm の吸光度を測定し、1 mg/ml を1.350Dとして算出した。

## 【0130】

参考例 11. 再構成ヒト抗HM1.24 抗体の活性測定

再構成ヒト抗HM1.24抗体は下記の抗原結合活性および結合阻害活性にて評価を行った。

## 1. 抗原結合活性および結合阻害活性の測定法

## 1-1. 抗原結合活性の測定

抗原結合活性の測定は、WISH細胞を用いたCell-ELISAで行った。Cell-ELISAプレートは前記参考例7.1-2で記載の通り作製した。

## 【0131】

ブロッキングの後、COS-7 細胞の培養上清を濃縮して得られた、またはCHO 細胞の培養上清より精製された再構成ヒト抗HM1.24抗体を段階希釈して各穴に100  $\mu$ l 加え、室温にて2時間インキュベーションおよび洗浄の後、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ヒトIgG 抗体 (DAKO社製) を加えた。室温にて1時間インキュベーションおよび洗浄の後、基質溶液を加えインキュベーションの後、6N 硫酸50  $\mu$ l で反応を停止させ、MICROPLATE READER Model 3550 (Bio-Rad 社製) を用いて490nm での吸光度を測定した。

## 【0132】

## 1-2. 結合阻害活性の測定

ビオチン標識マウス抗HM1.24抗体による結合阻害活性は、WISH細胞を用いたCell-ELISAで行った。Cell-ELISA プレートは前述の通り作製した。ブロッキングの後、COS-7 細胞の培養上清を濃縮して得られた、またはCHO 細胞の培養上清より精製された再構成ヒト抗HM1.24抗体を段階希釈して各穴に50  $\mu$ l 加え、同時に2  $\mu$ g/mlのビオチン標識マウス抗HM1.24抗体50  $\mu$ l を添加し、室温にて2時間インキュベーションおよび洗浄の後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (DAKO社製) を加えた。室温にて1時間インキュベーションした後洗浄し、基質溶液を加えインキュベーションの後、6N 硫酸50  $\mu$ l で反応を停止させ、MICROPLATE READER Model 3550 (Bio-Rad 社製) を用いて490nm での吸光度を測定した。

### 【0133】

#### 2. 再構成ヒト抗HM1.24抗体の評価

##### 2-1. L鎖

再構成ヒト抗HM1.24抗体のL鎖バージョンaの評価は、前記の抗原結合活性の測定により行った。図8に示す通り、L鎖バージョンaはキメラH鎖と組合わせて発現させると、キメラ抗HM1.24抗体と同程度の抗原結合活性を示した。しかし、さらなる活性の上昇またはH鎖との相性を考慮し、新たにL鎖バージョンbを作製した。そして、H鎖のバージョンa、b、f又はhと組み合わせたときの抗原結合活性および結合阻害活性の測定を行いL鎖バージョンa、bを共に評価した。図9、10、11及び12に示すとおり、H鎖a、b、f及びhの全てのバージョンで、L鎖バージョンaがバージョンbに比べて両活性とも強かった。従って、再構成ヒト抗HM1.24抗体のL鎖バージョンaを以下の実験に用いた。

### 【0134】

#### 2-2. H鎖バージョンa-e

再構成ヒト抗HM1.24抗体のH鎖バージョンa-eの評価はL鎖バージョンaとの組合せで、前記の抗原結合活性および結合阻害活性の測定により行った。その結果、図11、13、14及び15に示す通り、全てのバージョンにおいてキメラ抗HM1.24抗体と比較して両活性とも弱く、さらなるアミノ酸の変換が必要であると考えられた。

### 【0135】

## 2-3. H鎖ハイブリッド抗体

H鎖ハイブリッド抗体の評価は前記の抗原結合活性の測定により行った。その結果、図16に示す通り、抗原結合活性はヒト・マウスハイブリッド抗HM1.24抗体ではキメラ抗HM1.24抗体と同等の活性を有している一方、マウス・ヒトハイブリッド抗HM1.24抗体はキメラ抗HM1.24抗体と比較してその活性が弱かった。従って、マウス抗HM1.24抗体、あるいはキメラ抗HM1.24抗体と同等の抗原結合活性を有する再構成ヒトHM1.24抗体を作成するためには、H鎖V領域のうち、FR3あるいはFR4に含まれるアミノ酸を変換する必要があることが示された。

【0136】

## 2-4. H鎖バージョン f-r

再構成ヒト抗HM1.24抗体のH鎖バージョンfの評価は前記の抗原結合活性測定により行った。その結果、図17に示す通り、抗原結合活性はキメラ抗HM1.24抗体と比較すると劣るが、上記バージョンa-cと比較して活性が向上したことから、本バージョンで新たに変換した67、69、75及び78番目の4つのアミノ酸のうちいずれかが再構成ヒト抗体の活性に関与していることが示唆された。

【0137】

再構成ヒト抗HM1.24抗体のH鎖バージョンgの評価は前記の抗原結合活性、および結合阻害活性の測定により行った。その結果、図18及び19に示す通り、本バージョンは上記バージョンaと同程度の活性しか示さなかったことから、上記H鎖ヒト・マウスハイブリッド抗体の評価で示した通り、本バージョンで変換した40番目のアミノ酸は再構成ヒト抗体の活性の向上には寄与していないことが示された。

【0138】

再構成ヒト抗HM1.24抗体のH鎖バージョンh-jの評価は前記の抗原結合活性、および結合阻害活性の測定により行った。その結果、図20、21、22、23に示す通り、全てのversionで両活性ともキメラ抗HM1.24抗体と比較すると弱く、上記バージョンfと同程度であることから、バージョンfで新たに変換した4アミノ酸のうち、67及び69番目のアミノ酸は再構成ヒト抗体の活性の向上に寄与していないことが示唆された。

## 【0139】

再構成ヒト抗HM1.24抗体のH鎖バージョンk-pの評価は前記の抗原結合活性、および結合阻害活性の測定により行った。その結果、図24、25、26及び27に示す通り、全てのバージョンで両活性ともキメラ抗HM1.24抗体と比較すると弱く、上記バージョンhと同程度であることから、これら6つのバージョンで新たに変換した80番目以降のアミノ酸は再構成ヒト抗体の活性の向上に寄与していないことが示唆された。

再構成ヒト抗HM1.24抗体のH鎖バージョンqの評価は前記の抗原結合活性、および結合阻害活性の測定により行った。その結果、図25及び27に示す通り、本バージョンは両活性とも上記バージョンhあるいはバージョンpと比較すると弱く、上記バージョンaと同程度の活性しか持たなかったことから、78番目のアミノ酸の置換が再構成ヒト抗体の活性の向上に必須であることが示唆された。

## 【0140】

再構成ヒト抗HM1.24抗体のH鎖バージョンrの評価は前記の測定により行った。その結果、図15及び28に示す通り、バージョンrはキメラ抗HM1.24抗体と同程度の抗原結合活性および結合阻害活性を有することが示された。

以上の結果より、再構成ヒト抗HM1.24抗体がマウス抗HM1.24抗体あるいはキメラ抗HM1.24抗体と同程度の抗原結合能を持つための、H鎖における必要で最小の変換は30、71及び78番目、さらには73番目のアミノ酸であることが示された。

なお、再構成ヒト抗HM1.24抗体H鎖バージョンa-rについて、その抗原結合活性、および結合阻害活性を表2にまとめた。

## 【0141】

【表2】

表 2

H 鎖 バージョン	抗原結合活性	結合阻害活性
a	+	+
b	+	+
c	+	+
d	+	測定せず
e	+	測定せず
f	++	++
g	+	+
h	++	++
i	++	++
j	++	++
k	++	++
l	++	++
m	++	++
n	++	++
o	++	++
p	++	++
q	+	+
r	+++	+++

【0142】

また、再構成ヒト抗HM1.24抗体、L鎖バージョンaおよびbのアミノ酸の配列を表3に示し、再構成ヒト抗HM1.24抗体H鎖バージョンa-rのアミノ酸配列を表4～6に示す。

【0143】



【表 3】

表 3

L 鎖 V 領域のアミノ酸配列

	FR1		CDR1	FR2
	1	2	3	4
AHM	12345678901234567890123	45678901234	5678901234	567890123456789
HuSG I	DIVMTQSHKPMSTSVGDRVSITC	KASQDVNTAVA	WYQQKPGQSPKLLIY	
REI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC		WYQQKPGKAPKLLIY	
RVL a	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC		WYQQKPGKAPKLLIY	
RVL b	-----	-----	-----	-----

	CDR2	FR3		
	5	6	7	8
AHM	0123456	7890123456789012345678		
HuSG I	SASNRYT	GVPDRITGSGSGTDFTFTISSVQAEDLALYYC		
REI		GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC		
RVL a	-----	GVPSRFGSGSGTDFTFTISLQPEDFATYYC		
RVL b	-----	-----Y-----		

	CDR3	FR4
	9	10
AHM	901234567	8901234567
HuSG I	QQHYSTPFT	FGSGTKLEIK
REI		FGQGTKVEIK
RVL a	-----	FGQGTKVEIK
RVL b	-----	-----

【0144】

【表4】

表 4

H鎖V領域のアミノ酸配列(1)

	FR1									CDR1			FR2								
	1			2			3			4											
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	12345	67890	123456789	123456789	123456789	123456789	123456789	123456789	123456789	123456789	123456789	123456789
AHM	QVQL	QQSG	AELAR	PGAS	VKL	SCKAS	GYTFT	PYWMQ	WVKQR	PGQ	GLEW	IG	WVKQR	PGQ	GLEW	IG	WVKQR	PGQ	GLEW	IG	WVKQR
HuSGI	EVQL	VQSG	ADVKK	PGXS	VXV	SCKAS	GYTFS		WVRQA	PGX	GLDW	VG	WVRQA	PGX	GLDW	VG	WVRQA	PGX	GLDW	VG	WVRQA
HG3	QVQL	VQSG	AEVKK	PGAS	VKV	SCKAS	GYTFN		WVRQA	PGQ	GLEW	MG	WVRQA	PGQ	GLEW	MG	WVRQA	PGQ	GLEW	MG	WVRQA
RVHa	-----	-----	-----	-----	-----	-----	T	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
RVHb	-----	-----	-----	-----	-----	-----	T	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
RVHc	-----	-----	-----	-----	-----	-----	T	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
RVHd	-----	-----	-----	-----	-----	-----	T	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
RVHe	-----	-----	-----	-----	-----	-----	T	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
RVHf	-----	-----	-----	-----	-----	-----	T	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
RVHg	-----	-----	-----	-----	-----	-----	T	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
RVHh	-----	-----	-----	-----	-----	-----	T	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
RVHi	-----	-----	-----	-----	-----	-----	T	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
RVHj	-----	-----	-----	-----	-----	-----	T	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
RVHk	-----	-----	-----	-----	-----	-----	T	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
RVHl	-----	-----	-----	-----	-----	-----	T	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
RVHm	-----	-----	-----	-----	-----	-----	T	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
RVHn	-----	-----	-----	-----	-----	-----	T	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
RVHo	-----	-----	-----	-----	-----	-----	T	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
RVHp	-----	-----	-----	-----	-----	-----	T	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
RVHq	-----	-----	-----	-----	-----	-----	T	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
RVHr	-----	-----	-----	-----	-----	-----	T	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

【0145】

【表 5】

表 5

H鎖V領域のアミノ酸配列(2)

	CDR2					FR3					8					9				
	5	6	7	8	9	5	6	7	8	9	5	6	7	8	9	5	6	7	8	9
012A3456789012345	67890123456789012	ABC345678901234																		
SIFPGDGDTRYSQKPKG	KATLTADKSSSTAYMQLS	ILAFEDSAVYYCAR																		
	RVHb	RVHc	RVHd	RVHe	RVHf	RVHg	RVHh	RVHi	RVHj	RVHk	RVHl	RVHm	RVHn	RVHo	RVHp	RVHq	RVHr			
RVHa	RVHb	RVHc	RVHd	RVHe	RVHf	RVHg	RVHh	RVHi	RVHj	RVHk	RVHl	RVHm	RVHn	RVHo	RVHp	RVHq	RVHr			
RVHb	RVHc	RVHd	RVHe	RVHf	RVHg	RVHh	RVHi	RVHj	RVHk	RVHl	RVHm	RVHn	RVHo	RVHp	RVHq	RVHr				
RVHc	RVHd	RVHe	RVHf	RVHg	RVHh	RVHi	RVHj	RVHk	RVHl	RVHm	RVHn	RVHo	RVHp	RVHq	RVHr					
RVHd	RVHe	RVHf	RVHg	RVHh	RVHi	RVHj	RVHk	RVHl	RVHm	RVHn	RVHo	RVHp	RVHq	RVHr						
RVHe	RVHf	RVHg	RVHh	RVHi	RVHj	RVHk	RVHl	RVHm	RVHn	RVHo	RVHp	RVHq	RVHr							
RVHf	RVHg	RVHh	RVHi	RVHj	RVHk	RVHl	RVHm	RVHn	RVHo	RVHp	RVHq	RVHr								
RVHg	RVHh	RVHi	RVHj	RVHk	RVHl	RVHm	RVHn	RVHo	RVHp	RVHq	RVHr									
RVHh	RVHi	RVHj	RVHk	RVHl	RVHm	RVHn	RVHo	RVHp	RVHq	RVHr										
RVHi	RVHj	RVHk	RVHl	RVHm	RVHn	RVHo	RVHp	RVHq	RVHr											
RVHj	RVHk	RVHl	RVHm	RVHn	RVHo	RVHp	RVHq	RVHr												
RVHk	RVHl	RVHm	RVHn	RVHo	RVHp	RVHq	RVHr													
RVHl	RVHm	RVHn	RVHo	RVHp	RVHq	RVHr														
RVHm	RVHn	RVHo	RVHp	RVHq	RVHr															
RVHn	RVHo	RVHp	RVHq	RVHr																
RVHo	RVHp	RVHq	RVHr																	
RVHp	RVHq	RVHr																		
RVHq	RVHr																			
RVHr																				

【0146】

【表6】

表 6

## H鎖V領域のアミノ酸配列

	CDR3 10	FR4 11
AHM	57890ABJK12	34567890123
HuSGI	GLRRGGYYFDY	WGQGTTLTVSS
JH6		WGQGTTLTVSS
RVHa	-----	-----
RVHb	-----	-----
RVHc	-----	-----
RVHd	-----	-----
RVHe	-----	-----
RVHf	-----	-----
RVHg	-----	-----
RVHh	-----	-----
RVHi	-----	-----
RVHj	-----	-----
RVHk	-----	-----
RVHl	-----	-----
RVHm	-----	-----
RVHn	-----	-----
RVHo	-----	-----
RVHp	-----	-----
RVHq	-----	-----
RVHr	-----	-----

【0147】

## 3. 精製再構成ヒト抗HM1.24抗体の評価

前記精製再構成ヒト抗HM1.24抗体は前記の抗原結合活性および結合阻害活性にて評価を行った。その結果、図31及び32に示す通り再構成ヒト抗HM1.24抗体は、キメラ抗HM1.24抗体と同程度の抗原結合活性および結合阻害活性を有することが示された。このことより、再構成ヒト抗HM1.24抗体はマウス抗HM1.24抗体と同じ抗原結合能を持つことが示された。

【0148】

## 参考例12. マウス抗HM1.24モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの調製

Goto, T. et al., Blood (1994) 84, 1992-1930 に記載の方法にて、マウス抗HM1.24モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製した。

ヒト多発性骨髄腫患者の骨髄に由来するエプスタインバーウイルス核抗原 (EBNA) - 陰性形質細胞株KPC-32 ( $1 \times 10^7$  個) (Goto, T. et al., Jpn. J. Clin. Hematol. (1991) 32, 1400) をBALB/Cマウス (チャールスリバー製) の腹腔内に6週間おきに2回注射した。

【0149】

このマウスを屠殺する3日前にマウスの抗体産生価をさらに上昇させるために、 $1.5 \times 10^6$  個のKPC-32細胞をマウスの脾臓内に注射した (Goto, T. et al., Tokushima J. Exp. Med. (1990) 37, 89)。マウスを屠殺した後に脾臓を摘出し、Groth, de St. & Schreideggerの方法 (Cancer Research (1981) 41, 3465) に従い摘出した脾臓細胞とミエローマ細胞SP2/0を細胞融合に付した。

【0150】

KPC-32細胞をコートしたプレートを使用するELISA (Posner, M. R. et al., J. Immunol. Methods (1982) 48, 23) によりハイブリドーマ培養上清中の抗体のスクリーニングを行った。 $5 \times 10^4$  個のKPC-32細胞を50 ml のPBSに懸濁し、96ウェルプレート (U底型、Corning、Iwaki製) に分注した。1%ウシ血清アルブミン (BSA) を含むPBSでブロックした後、ハイブリドーマ培養上清を加え4℃にて2時間インキュベートした。次いで、4℃にて1時間ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgGヤギ抗体 (Zymed製) を反応させ、一度洗浄して、室温にて30分間o-フェニレンジアミン基質溶液 (Sumitomo Bakelite製) を反応させた。

【0151】

2N硫酸で反応を停止させ、ELISA reader (Bio-Rad製) で492nmにおける吸光度を測定した。ヒト免疫グロブリンに対する抗体を産生するハイブリドーマを除去するために、陽性ハイブリドーマ培養上清をヒト血清にあらかじめ吸着させ、他の細胞下部に対する反応性をELISAにてスクリーニングした。陽性のハイブリドーマを選択し、種々の細胞株およびヒトの標本に対する反応性をフローサイトメトリーで調べた。最後に選択されたハイブリドーマクローンを二度クローン化し、これをプリスタン処理したBALB/Cマウスの腹腔に注射して、腹水を取得した。

【0152】

モノクローナル抗体は、硫酸アンモニウムによる沈澱とプロテインA アフィニティクロマトグラフィーキット (Ampure PA、Amersham製) によりマウス腹水より精製した。精製抗体は、Quick Tag FITC結合キット (ベーリンガーマンハイム製) を使用することによりフルオロセイニチオシアネート (FITC) と結合させた。

その結果、30のハイブリドーマクローンが産生するモノクローナル抗体がKPC-32およびRPMI 8226 細胞と反応した。クローニングの後、これらのハイブリドーマの培養上清を他の細胞株と末梢血由来単核球との反応性を調べた。

#### 【0153】

このうち、3つのクローンが形質細胞に特異的に反応するモノクローナル抗体であった。これらの3つのクローンのうち、最もフローサイトメトリー分析に有用であり、かつRPMI 8226 細胞に対する補体依存性細胞障害活性を有するハイブリドーマクローンを選択し、HM1.24と名付けた。このハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体のサブクラスを、サブクラス特異的抗マウスウサギ抗体 (Zymed 製) を用いたELISA にて決定した。抗HM1.24抗体は、IgG2a  $\kappa$  のサブクラスを有していた。抗HM1.24抗体を産生するハイブリドーマHM1.24は、工業技術院生命工学工業研究所 (茨城県つくば市東1丁目1番3号) に、平成7年9月14日にFERM BP-5233としてブタペスト条約に基づき国際寄託された。

#### 【0154】

##### 参考例13. HM1.24抗原ポリペプチドをコードするcDNAのクローニング

##### 1. cDNAライブラリーの作製

##### 1) 全RNA の調製

マウスモノクローナル抗体HM1.24が特異的に認識する抗原ポリペプチドであるHM1.24抗原をコードするcDNAを以下のように単離した。

ヒト多発性骨髄腫細胞株KPM2 から、全RNA をChirgwinら (Biochemistry, 18, 5294 (1979))の方法に従って調製した。すなわち、 $2.2 \times 10^8$  個のKPM2 を20 mlの4Mグアニジンチオシアネート (ナカライテスク製) 中で完全にホモジナイズさせた。

#### 【0155】

ホモジネートを遠心管中の5.3M塩化セシウム溶液層状に重層し、次にこれをBeckman SW40ローター中で31,000rpmにて20℃で24時間遠心分離することによりRNAを沈殿させた。RNA沈殿物を70%エタノールにより洗浄し、そして1mM EDTA及び0.5% SDSを含有する10mM Tris-HCl (pH 7.4) 300  $\mu$ l中に溶解し、それにPronase(Boehringer製)を0.5mg/mlとなるように添加した後、37℃にて30分間インキュベートした。混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、RNAをエタノールで沈殿させた。次に、RNA沈殿物を1mM EDTAを含有する10mM Tris-HCl (pH 7.4) 200  $\mu$ lに溶解した。

## 【0156】

## 2) poly(A) + RNA の調製

前記のようにして調製した全RNAの約500  $\mu$ gを材料としてFast Track 2.0m RNA Isolation Kit(Invitrogen製)を用いてキット添付の処方に従ってpoly(A) + RNAを精製した。

## 【0157】

## 3) cDNAライブラリーの構築

上記poly(A) + RNA 10  $\mu$ gを材料としてcDNA合成キットTimeSaver cDNA Synthesis Kit(Pharmacia製)を用いてキット添付の処方に従って二本鎖cDNAを合成し、更にDirectional Cloning Toolbox (Pharmacia製)を用いてキット付属のEcoRIアダプターをキット添付の処方に従って連結した。EcoRIアダプターのライネーション及び制限酵素NotI処理はキット添付の処方に従って行った。更に、約500bp以上の大きさのアダプター付加二本鎖cDNAを1.5%低融点アガロースゲル(Sigma製)を用いて分離、精製し、アダプター付加二本鎖cDNA約40  $\mu$ lを得た。

## 【0158】

このようにして作製したアダプター付加二本鎖cDNAを、あらかじめ制限酵素EcoRI、NotI及びアルカリフォスファターゼ(宝酒造製)処理したpCOS1ベクター(特願平8-255196)とT4 DNAリガーゼ(GIBCO-BRL製)を用いて連結し、cDNAライブラリーを構築した。構築したcDNAライブラリーは、大腸菌細胞株DH5  $\alpha$  (GIBCO-BRL製)に形質導入され、全体のサイズは約 $2.5 \times 10^6$ 個の独立したクローンであると推定された。

【0159】

2. 直接発現法によるクローニング

1) COS-7 細胞へのトランスフェクション

上記の形質導入した大腸菌約  $5 \times 10^5$  クローンを  $50 \mu\text{g/ml}$  のアンピシリンを含む2-YT培地 (Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Sambrookら, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) にて培養することによりcDNAの増幅を行い、アルカリ法 (Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Sambrookら, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) により大腸菌からプラスミドDNAを回収した。得られたプラスミドDNAはGene Pulser装置(Bio-Rad製)を用いてエレクトロポレーション法によりCOS-7細胞にトランスフェクションした。

【0160】

すなわち、精製したプラスミドDNA  $10 \mu\text{g}$  を  $1 \times 10^7$  細胞/ml でPBS中に懸濁したCOS-7細胞液0.8mlに加え、1500V、 $25 \mu\text{FD}$ の容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞は、10%牛胎児血清(GIBCO-BRL製)を含むDMEM培養液(GIBCO-BRL製)にて、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ の条件下で3日間培養した。

【0161】

2) パンニングデイッシュの調製

マウス抗HM1.24抗体をコーティングしたパンニングデイッシュを、B.Seedら (Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 84, 3365-3369 (1987)) の方法に従って調製した。すなわち、マウス抗HM1.24抗体を  $10 \mu\text{g/ml}$  になるように50mM Tris-HCl (pH 9.5)に加えた。このようにして調製した抗体溶液3mlを直径60mmの細胞培養皿に加え、室温にて2時間インキュベートした。0.15M NaCl溶液にて3回洗浄した後、5%牛胎児血清、1mM EDTA、0.02%  $\text{NaN}_3$  を含むPBSを加え、ブロッキングした後、下記クローニングに用いた。

【0162】

3) cDNAライブラリーのクローニング

前述のようにトランスフェクトしたCOS-7細胞は、5mM EDTAを含むPBSにて剥がし、5%牛胎児血清を含むPBSで一回洗浄した後、約  $1 \times 10^6$  細胞/mlとなる



ように5%牛胎児血清及び0.02%  $\text{NaN}_3$  を含むPBS に懸濁し、上記のように調製したパンニングデイシュに加え、室温にて約2時間インキュベートした。5%牛胎児血清及び0.02%  $\text{NaN}_3$  を含むPBS で3度緩やかに洗浄した後、0.6% SDS及び10mM EDTA を含む溶液を用いてパンニングデイシュに結合した細胞からプラスミドDNA の回収を行った。

## 【0163】

回収したプラスミドDNA を再び大腸菌DH5  $\alpha$  に形質導入し、前述のようにプラスミドDNA を増幅後、アルカリ法にて回収した。回収したプラスミドDNA をCOS-7細胞にエレクトロポレーション法によりトランスフェクトして前述と同様に結合した細胞よりプラスミドDNA の回収を行った。同様の操作を更に1回繰り返し、回収したプラスミドDNA を制限酵素EcoRI およびNotIで消化した結果、約0.9kbpのサイズのインサートの濃縮が確認された。さらに、回収したプラスミドDNA の一部を形質導入した大腸菌を50  $\mu\text{g/ml}$  のアンピシリンを含む2-YTアガープレートに接種し、一晚培養後、単一のコロニーよりプラスミドDNA を回収した。制限酵素EcoRI およびNotIにて消化し、インサートのサイズが約0.9kbpを示すクローンp3.19を得た。

## 【0164】

本クローンについては、PRISM, Dye Terminator Cycle Sequencingキット (Perkin Elmer製) を用いて、キット添付の処方に従い反応を行い、ABI 373A DNA Sequencer (Perkin Elmer製) にて塩基配列の決定を行った。このアミノ酸配列および塩基配列を配列番号103 に示す。

配列番号: 103 に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするcDNAはpUC19 ベクターのXbaI切断部位の間に挿入されて、プラスミドpRS38-pUC19 として調製されている。このプラスミドpRS38-pUC19 を含む大腸菌(E. coli) は平成5年(1993年)10月5日付で工業技術院生命工学工業技術研究所(茨城県つくば市東1丁目1番3号)にEscherichia coli DH5  $\alpha$  (pRS38-pUC19)として、受託番号FERM BP-4434としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている(特開平7-196694参照)。

## 【0165】

## 【実施例】

以下に、本発明の天然FR配列で構成される天然ヒト型化抗体の一つの例としてヒト型化抗HM1.24抗体に基づく天然ヒト型抗体の製造例を示す。

実施例 1

マウスモノクローナル抗体HM1.24抗体は、参考例に記載されたようにCDR-graftingにより再構成ヒト抗HM1.24抗体としてヒト型化された。その際、ヒト型化H鎖構築のためにFR1 からFR3 まではヒト抗体HG3 の各FRが選択され、さらにFR4 についてはヒト抗体JH6 のFR4 が選択された。FRアミノ酸残基について検討を行った結果、4箇所（FR1/30, FR3 / 71,73,78）のアミノ酸置換が必要であった（表7及び表8）。本ヒト型化抗体は元のマウス抗体と同等の抗原結合活性を有した。本ヒト型化抗体（RVLa/RVHr から成るヒト型化抗体）を1次デザイン抗体とした。

【0166】

【表 7】

天然ヒト型化抗体のV領域のデザイン

A) L鎖	FR1					CDR1					FR2					CDR2				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
HM1.24	12345678901234567890123	45678901234	5678901234	567890123456789	0123456															
HUSG I	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC	KASQDVNTAVA	WYQQKPGQSPKLLIY	SASNRYT																
REI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC		WYQQKPGKAPKLLIY																	
	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC		WYQQKPGKAPKLLIY																	

1次デザイン (RVLa)

2次デザイン

HM1.24	FR3					CDR3					FR4				
	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
HUSG I	78901234567890123456789012345678	901234567	8901234567	FGSGTKLEIK											
REI	GVPDRITGSGSGTDFTTISVQAEDLALYYC	QQHYSTPFT	FGSGTKLEIK												
	GVPDRITGSGSGTDFTTISVQAEDLALYYC	QQHYSTPFT	FGSGTKLEIK												
	GVPDRITGSGSGTDFTTISVQAEDLALYYC	QQHYSTPFT	FGSGTKLEIK												

1次デザイン (RVLa)

2次デザイン

【0167】

【表 8】

天然ヒト型抗体のV領域のデザイン

B) H鎖	FR1	1	2	3	CDR1	FR2	4	5	6	CDR2
HM1.24	123456789012345678901234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890123456789	012A3456789012345	012A3456789012345	012A3456789012345	012A3456789012345	012A3456789012345
HUSGI	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFT	PYWMQ	WVKQRPQG	LEWIG	SIFPGD	GDT	TRY	SQ	KFKG	
HG3	EVQLVQSGADVKKPGXSVXVSKASGYTFS		WVRQAPGXGLDWVG							
	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFN		WVRQAPGQGLEWMG							
1次アミノ酸 (RVHr)	-----T-----									
2次アミノ酸 (2ndRVH)	-----T-----									
	FR3	7	8	9	CDR3	10	FR4	11		
HM1.24	67890123456789012ABC345678901234	57890ABJK12					34567890123			
HUSGI	KATLTADKSSSTAYMQLSILAFEDSAVYYCAR	GLRRGGYYFDY					WGQGTTLTVSS			
HG3/JH6	RVTXTXDXSXNTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR						WGQGTTLTVSS			
	RVTMTTRDTSTSTVMELSSLRSEDTAVYYCAR						WGQGTTLTVSS			
1次アミノ酸 (RVHr)	-----A-K-----A-----									
2次アミノ酸 (2ndRVH)	-----I-A-K-----A-----									

### (1) H鎖の構築

1 次デザイン抗体のFRについて天然に見出されているヒトFRに対する相同性検索をSwiss Plot、GenBank、PRF、PIR、GenPeptのデータベースを用いて実施した。まず、FR1 については完全にアミノ酸配列が一致する50個のヒトFRが見出された。すなわち、本1次デザイン抗体のFR1 はすでに天然配列を有していた。FR2 およびFR4 については、もともとアミノ酸置換は行われていないので、HG3 およびJH6 をはじめとしてそれぞれ50個および100個の天然のヒト抗体FRが存在した。

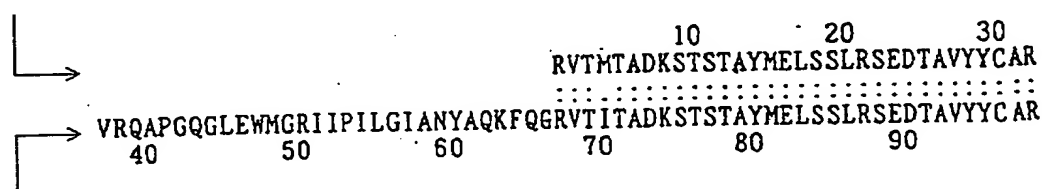
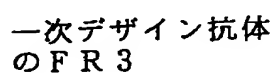
【0169】

一方、FR3 については完全に一致したものは見出されなかった。最も高い相同性を有するFR3 として、96.875% の相同性を有するS46463、1921296C、HUMIGHRF 1、U00583 1等（記号はいずれもデータベースの登録番号）が見出された。

従って、本1次デザイン抗体においてはFR3 が天然に見出されない人工的なアミノ酸残基を含むFRであった。最大の相同性を示すヒト抗体S46463とのアミノ酸配列の比較を表9に示した。

【 0 1 7 0 】

【表 9】



S 4 6 4 6 3 抗体  
の F R 3

【0 1 7 1】

1 次デザイン抗体のFR3 では70位のアミノ酸残基がメチオニンであり、一方ヒト抗体S46463のFR3 ではイソロイシンであった。その他のアミノ酸配列は完全に一致した。従って、1 次デザイン抗体の70位のアミノ酸残基をイソロイシンに置換し、天然に存在するFR3 に変換した。したがって、得られる2 次デザイン抗体

は、ヒト抗体S46463の天然ヒトFRで構成されたCDR-grafting抗体である。こうして構築された2次デザイン抗体は全て天然に存在するFRから構成される。

#### 【0172】

##### (2) 天然ヒト型化抗HM1.24抗体H鎖V領域の作製

天然ヒト型化抗HM1.24抗体H鎖V領域を、PCRを用いる変異誘発法によって作製した。変異原プライマーSS（配列番号：100）およびSA（配列番号：101）は、69位のメチオニンがイソロイシンに変異するように設計した。

参考例に記載したプラスミドHEF-RVHr-AHM-g $\gamma$ 1を鋳型とし、上記プライマーを用いて増幅した後、最終生成物を精製し、BamHIおよびHindIIIで消化し、得られたDNA断片をHEF発現ベクターHEF-VH-g $\gamma$ 1にクローニングし、プラスミドHEF-RVHs-AHM-g $\gamma$ 1を得た。本プラスミドHEF-RVHs-AHM-g $\gamma$ 1に含まれるH鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号102に示す。

なお、前記プラスミドHEF-RVHs-AHM-g $\gamma$ 1からの可変領域をコードする領域を制限酵素HindIII およびBamHIにより制限断片とし、これをプラスミドベクターpUC19のBamHI およびHindIII 部位に挿入した。得られたプラスミドをpUC19-RVHs-AHM-g $\gamma$ 1と命名した。

プラスミドpUC19-RVHs-AHM-g $\gamma$ 1を含有する大腸菌は、Escherichia coli DH5 $\alpha$ （pUC19-RVHs-AHM-g $\gamma$ 1）と称し、工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に平成9年（1997年）9月29日にFERM BP-6127としてブダペスト条約に基づき国際寄託された。

#### 【0173】

##### 2) L鎖の解析

1次デザイン抗体のL鎖の構築ではFRのアミノ酸は置換されなかったが、用いたヒト抗体REIはすでにアミノ酸置換が行われている改変FR（Riechmann, L. et al., Nature (1988) 332, 323-327）であったので、これらFRについても同様に相同性を検索した。その結果、この改変FRに相当する天然配列は存在した。したがって、L鎖FRのアミノ酸置換は必要ないことが判明した。

【0174】

実施例2. 天然ヒト型化抗HM1. 24抗体の作製

(1) 天然ヒト型化抗HM1. 24抗体の発現

天然ヒト型化抗HM1. 24抗体H鎖のための発現ベクター (HEF-RVHs-AHM-g $\gamma$ 1) と再構成ヒト抗HM1. 24抗体L鎖のための発現ベクター (HEF-RVL $\alpha$ -AHM-g $\kappa$ ) 各10 $\mu$ gをGene Pulser装置 (BioRad社製) を用いてエレクトロポレーションによりCOS細胞を同時形質転換した。各DNA (10 $\mu$ g) を、PBS中 $1 \times 10^7$  細胞/mlの0.8mlのアリコートに加え、1,500V、25 $\mu$ Fの容量にてパルスを与えた。

【0175】

室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、10%の $\gamma$ -グロブリンフリーウシ胎児血清を含有するDMEM培養液30ml (GIBCO社製) に加えた。37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>の条件下で72時間の培養をCO<sub>2</sub>インキュベーターBNA120D (TABAI社製) を用いて行った後、培養上清を集め、遠心ローター03 (HITACHI社製) を装着した遠心機05PR-22 (HITACHI社製) により1000rpm、5分間の遠心分離を行い細胞破片を除去し、マイクロコンセントレーター (Centricon

100, Amicon社製) を遠心ローターJA-20.1 (BECKMAN社製) を装着した遠心器J2-21 (BECKMAN社製) により2000rpmの条件下で限外濾過濃縮をおこない、濾過フィルター、マイレクスGV13mm (ミリポア社製) を用いて濾過滅菌したものをCell-ELISAにかけた。

【0176】

(2) 抗体濃度の測定

得られた抗体の濃度測定はELISA により行った。ELISA 用96穴プレート (Maxisorp, NUNC社製) の各穴にコーティングバッファー (0.1M NaHCO<sub>3</sub>, 0.02% NaN<sub>3</sub>, pH9.6) により1 $\mu$ g/mlの濃度に調製したヤギ抗ヒトIgG 抗体 (BIO SOURCE社製) 100 $\mu$ lを加え、室温で1時間のインキュベーションを行い固相化した。100 $\mu$ lの希釈バッファー (50mM Tris-HCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.15M NaCl, 0.05% Tween20,

0.02%NaN<sub>3</sub>, 1%牛血清アルブミン (BSA), pH8.1)でブロッキングした後、限外濾過濃縮を行った天然ヒト型化抗HM1.24抗体を順次段階希釈して各穴に100  $\mu$ lずつ加え室温で1時間のインキュベーションおよび洗浄の後、アルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ヒトIgG 抗体 (DAKO社製) 100  $\mu$ lを加えた。

【0177】

室温にて1時間のインキュベーションおよび洗浄の後、基質バッファー (50mM NaHCO<sub>3</sub>, 10mM MgCl<sub>2</sub> (pH9.8)) に溶解した1mg/mlの基質溶液 (Sigma104, p-ニトロフェニルリン酸、SIGMA 社製) 100  $\mu$ lを加え、405nmでの吸光度をMICROPLATE READER Model 3550 (Bio-Rad社製) を用いて測定した。濃度測定の標品としてヒトIgG1 $\kappa$  (The Binding Site社製) を用いた。

【0178】

(3) 天然ヒト型化抗HM1.24抗体安定産生CHO細胞株の樹立

天然ヒト型化抗HM1.24抗体を安定的に産生するCHO細胞株は下記の方法にしたがえば樹立することができる。

(3)-1. 天然ヒト型化抗HM1.24抗体H鎖発現ベクターの作製

プラスミドHEF-RVHs-AHM-g $\gamma$ 1 を制限酵素PvuI及びBamHI にて消化し、EF1 プロモーター及び天然ヒト型化抗HM1.24抗体H鎖V領域をコードするDNA を含む約2.8 kbpの断片を 1.5%低融点アガロースゲルを用いて精製する。次に、DHFR遺伝子およびヒトH鎖定常領域をコードする遺伝子を含むヒトH鎖発現ベクターDHFR- $\Delta$ E-RVh-PM1f (国際特許出願公開番号WO92-19759)に使用されている発現ベクターをPvuI及びBamHI にて消化することにより調製する約6 kbpの断片内に上記DNA断片を挿入し、天然ヒト型化抗HM1.24抗体H鎖発現ベクターDHFR- $\Delta$ E-HEF-RVHs-AHM-g $\gamma$ 1 を構築する。

【0179】

(3)-2. CHO 細胞への遺伝子導入

天然ヒト型化抗HM1.24抗体安定産生系を樹立するために、PvuIで消化して直鎖状にした前記発現ベクターDHFR- $\Delta$ E-HEF-RVHs-AHM-g $\gamma$ 1 及びHEF-RVLa-AHM-g $\kappa$  をエレクトロポレーション法により前述と同様 (前記COS-7 細胞へのトランスフェクション) の条件下で同時にCHO 細胞DXB-11に遺伝子導入する。



## (3)-3. MTX による遺伝子増幅

遺伝子導入した CHO細胞は500  $\mu\text{g/ml}$ のG418 (GIBCO-BRL 社製) 及び10%のウシ胎児血清を添加したヌクレオシド不含 $\alpha$ -MEM培養液中 (GIBCO-BRL 社製) ではL鎖及びH鎖発現ベクターが共に導入されたCHO 細胞のみが増殖でき、それらを選別する。次に、上記培養液中に10 nM のMTX(Sigma 社製) を加え、増殖するクローンのうち天然ヒト型化抗HM1.24抗体の産生量が高いものを選択する。

【0180】

## (3)-4. 天然ヒト型化抗HM1.24抗体の作製

天然ヒト型化抗HM1.24抗体の作製は以下の方法で行う。上記天然ヒト型化抗HM1.24抗体産生CHO 細胞を、培地として10%の $\gamma$ -グロブリンフリーウシ胎児血清 (GIBCO-BRL 社製) を含有する500  $\mu\text{g/ml}$ のG418 (GIBCO-BRL 社製) を添加するヌクレオシド不含 $\alpha$ -MEM培養液 (GIBCO-BRL 社製) を用い、37℃、5%CO<sub>2</sub> の条件下で10日の培養をCO<sub>2</sub> インキュベーターBNA120D (TAKAI 社製) を用いて行う。培養開始後8、10日目に培養液を回収し、TS-9ローターを装着した遠心機RL-500SP (トミー精工社製) を用いて2000rpm、10分間の遠心分離を行い培養液中の細胞破片を除去した後、0.45  $\mu\text{m}$  径のメンブレンをもつボトルトップフィルター (FALCON社製) により濾過滅菌する。

【0181】

この天然ヒト型化抗HM1.24抗体産生CHO 細胞培養液に等量のPBS(-)を加えた後、高速抗体精製装置ConSep LC100 (MILLIPORE 社製) およびHyper D Protein A カラム (日本ガイシ社製) を用い、付属の説明書に基づき吸着緩衝液としてPBS(-)、溶出緩衝液として0.1M クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH3) を用いて天然ヒト型化抗HM1.24抗体をアフィニティー精製する。溶出画分は直ちに1M Tris-HCl (pH8.0) を添加してpH7.4 付近に調整した後、遠心限外濃縮器Centriprep 10 (MILLIPORE 社製) を用いて濃縮およびPBS(-)への緩衝液置換を行い、孔径0.22  $\mu\text{m}$ のメンブレンフィルターMILLEX-GV (MILLIPORE 社製) を用いて濾過滅菌し精製天然ヒト型化抗HM1.24抗体を得る。精製抗体の濃度は、280nm の吸光度を測定し、1 mg/ml を1.350Dとして算出する。

【0182】

### 実施例 3. 天然ヒト型化抗体の活性測定

天然ヒト型化抗HM1.24抗体は下記の抗原結合活性および結合阻害活性にて評価を行った。

#### (1) 抗原結合活性および結合阻害活性の測定法

##### (1)-1. 抗原結合活性の測定

抗原結合活性の測定は、WISH細胞を用いたCell-ELISAで行った。Cell-ELISAプレートは前記参考例 7.1-2で記載の通り作製した。

#### 【0183】

ブロッキングの後、COS-7 細胞の培養上清を濃縮して得られた天然ヒト型化抗HM1.24抗体を段階希釈して各穴に100  $\mu$ l 加え、室温にて2時間インキュベーションおよび洗浄の後、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ヒトIgG 抗体 (DAKO社製) を加えた。室温にて1時間インキュベーションおよび洗浄の後、基質溶液を加えインキュベーションの後、6N 硫酸50  $\mu$ l で反応を停止させ、MICROPLATE READER Model 3550 (Bio-Rad 社製) を用いて490nm での吸光度を測定した。

#### 【0184】

##### (1)-2. 結合阻害活性の測定

ビオチン標識マウス抗HM1.24抗体による結合阻害活性は、WISH細胞を用いたCell-ELISAで行った。Cell-ELISA プレートは前述の通り作製した。ブロッキングの後、COS-7 細胞の培養上清を濃縮して得られた天然ヒト型化抗HM1.24抗体を段階希釈して各穴に50  $\mu$ l 加え、同時に2  $\mu$ g/mlのビオチン標識マウス抗HM1.24抗体50  $\mu$ l を添加し、室温にて2時間インキュベーションおよび洗浄の後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (DAKO社製) を加えた。室温にて1時間インキュベーションした後洗浄し、基質溶液を加えインキュベーションの後、6N 硫酸50  $\mu$ l で反応を停止させ、MICROPLATE READER Model 3550 (Bio-Rad 社製) を用いて490nm での吸光度を測定した。

#### 【0185】

##### (2) 抗原結合活性および結合阻害活性

天然ヒト型化抗HM1.24抗体のH鎖の評価は、L鎖バージョンaとの組合せで前記の抗原結合活性、および結合阻害活性の測定により行った。その結果、図29

、30に示すように天然ヒト型化抗HM1.24抗体（二次デザイン抗体）は一次デザイン抗体（再構成ヒト抗HM1.24抗体：H鎖バージョンr）と同程度の抗原結合活性および結合阻害活性を有することが示された。

【0186】

本発明は、天然ヒトFRで構成される天然ヒト型化抗体の製造方法および該方法により得られた天然ヒト型化抗体に関する。本技術は、G.Winter によって考案されたCDR-grafting (Jones, P.T. et al., Nature (1986) 321, 522-525) の問題点を解決したより完成度の高いヒト型化技術である。1次デザイン抗体の構築は、天然ヒトFRで構成されるヒト型化抗体作成のための中間段階として位置づけられる。組み換え蛋白質による医薬品として抗体を開発する場合、天然に見出されているヒトFRで構成される天然ヒト型化抗体は、抗原性や安全性の点でより優れている。

【0187】

【発明の効果】

本発明の製造方法により得られる天然ヒト型化抗体は、従来のヒト型化抗体技術で得られるヒト型化抗体が含む天然に存在しない人工的なFRのアミノ酸残基を含有しないため、ヒトにおける抗原性が低いと推測される。さらに、本発明の製造方法により得られた天然ヒト型化抗体は、ヒト型化の鑄型となった非ヒト哺乳動物由来の抗体と同程度の活性を有することが示された。したがって、本発明の天然ヒト型化抗体はヒトに対する治療的な投与のため、有用である。

【0188】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：394

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

ATG GGC TTC AAG ATG GAG TCA CAT TTT CTG GTC TTT GTA TTC GTG TTT	48
Met Gly Phe Lys Met Glu Ser His Phe Leu Val Phe Val Phe Val Phe	
-20 -15 -10	
CTC TGG TTG TCT GGT GTT GAC GGA GAC ATT GTG ATG ACC CAG TCT CAC	96
Leu Trp Leu Ser Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His	
-5 -1 1 5	
AAA TTC ATG TCC ACA TCA GTA GGA GAC AGG GTC AGC ATC ACC TGC AAG	144
Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys	
10 15 20	
GCC AGT CAG GAT GTG AAT ACT GCT GTA GCC TGG TAT CAA CAA AAA CCA	192
Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro	
25 30 35 40	
GGA CAA TCG CCT AAA CTA CTG ATT TAC TCG GCA TCC AAC CGG TAC ACT	240
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr	
45 50 55	
GGA GTC CCT GAT CGC ATC ACT GGC AGT GGA TCT GGG ACG GAT TTC ACT	288
Gly Val Pro Asp Arg Ile Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr	
60 65 70	
TTC ACC ATC AGC AGT GTG CAG GCG GAA GAC CTG GCA CTT TAT TAC TGT	336
Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Leu Tyr Tyr Cys	
75 80 85	

CAG CAA CAT TAT AGT ACT CCA TTC ACG TTC GGC TCG GGG ACA AAG TTG 384  
Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu

90

95

100

GAA ATA AAA C 394

Glu Ile Lys

105

【0189】

配列番号：2

配列の長さ：418

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

ATG GAA TGT AAC TGG ATA CTT CCT TTT ATT CTG TCA GTA ACT TCA GGT 48

Met Glu Cys Asn Trp Ile Leu Pro Phe Ile Leu Ser Val Thr Ser Gly

-15

-10

-5

GCC TAC TCA CAG GTT CAA CTC CAG CAG TCT GGG GCT GAG CTG GCA AGA 96

Ala Tyr Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg

-1 1

5

10

CCT GGG GCT TCA GTG AAG TTG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTT 144

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

15

20

25

ACT CCC TAC TGG ATG CAG TGG GTA AAA CAG AGG CCT GGA CAG GGT CTG 192

Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

30

35

40

45

GAA TGG ATT GGG TCT ATT TTT CCT GGA GAT GGT GAT ACT AGG TAC AGT 240

Glu Trp Ile Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser

50

55

60

CAG AAG TTC AAG GGC AAG GCC ACA TTG ACT GCA GAT AAA TCC TCC AGT 288  
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser

65

70

75

ACA GCC TAC ATG CAA CTC AGC ATC TTG GCA TTT GAG GAC TCT GCG GTC 336  
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ile Leu Ala Phe Glu Asp Ser Ala Val

80

85

90

TAT TAC TGT GCA AGA GGA TTA CGA CGA GGG GGG TAC TAC TTT GAC TAC 384  
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr

95

100

105

TGG GGC CAA GGC ACC ACT CTC ACA GTC TCC TCA G 418  
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

110

115

120

【0190】

配列番号：3

配列の長さ：11

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala

5

10

【0191】

配列番号：4

配列の長さ：7

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr

5

【0192】

配列番号：5

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe Thr

5

【0193】

配列番号：6

配列の長さ：5

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Pro Tyr Trp Met Gln

5

【0194】

配列番号：7

配列の長さ：16

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Ser Ile Phe Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser Gln Lys Phe Lys Gly

5

10

15

【0195】

配列番号：8

配列の長さ：11

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr

5

10

【0196】

配列番号：9

配列の長さ：379

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TCC TTG GTA GCA ACA GCT ACA GGT 48

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Ser Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

-15

-10

-5

GTC CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG AGC GCC 96

Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala

-1 1

5

10

AGC GTG GGT GAC AGA GTG ACC ATC ACC TGT AAG GCT AGT CAG GAT GTG 144

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val

15

20

25

AAT ACT GCT GTA GCC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA AAG GCT CCA AAG 192

Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys

30

35

40

45



CTG CTG ATC TAC TCG GCA TCC AAC CGG TAC ACT GGT GTG CCA AGC AGA	240
Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg	
50 55 60	
TTC AGC GGT AGC GGT AGC GGT ACC GAC TTC ACC TTC ACC ATC AGC AGC	288
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser	
65 70 75	
CTC CAG CCA GAG GAC ATC GCT ACC TAC TAC TGC CAG CAA CAT TAT AGT	336
Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser	
80 85 90	
ACT CCA TTC ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA C	379
Thr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
95 100 105	

【0197】

配列番号：10

配列の長さ：379

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TCC TTG GTA GCA ACA GCT ACA GGT	48
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Ser Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly	
-15 -10 -5	
GTC CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG AGC GCC	96
Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala	
-1 1 5 10	
AGC GTG GGT GAC AGA GTG ACC ATC ACC TGT AAG GCT AGT CAG GAT GTG	144
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val	
15 20 25	

AAT ACT GCT GTA GCC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA AAG GCT CCA AAG	192
Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys	
30 35 40 45	
CTG CTG ATC TAC TCG GCA TCC AAC CGG TAC ACT GGT GTG CCA AGC AGA	240
Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg	
50 55 60	
TTC AGC GGT AGC GGT AGT GGT ACC GAC TAC ACC TTC ACC ATC AGC AGC	288
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser	
65 70 75	
CTC CAG CCA GAG GAC ATC GCT ACC TAC TAC TGC CAG CAA CAT TAT AGT	336
Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser	
80 85 90	
ACT CCA TTC ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA C	379
Thr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
95 100 105	

【0198】

配列番号：11

配列の長さ：418

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTC TTC TTC TTG CTG GCT GTA GCT CCA GGT	48
Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly	
-15 -10 -5	
GCT CAC TCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG	96
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
-1 1 5 10	

CCT GGG GCC TCA GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCA TCT GGA TAC ACC TTC	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
15 20 25	
ACT CCC TAC TGG ATG CAG TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT	192
Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
GAG TGG ATG GGA TCT ATT TTT CCT GGA GAT GGT GAT ACT AGG TAC AGT	240
Glu Trp Met Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser	
50 55 60	
CAG AAG TTC AAG GGC AGA GTC ACC ATG ACC GCA GAC ACG TCC ACG AGC	288
Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser	
65 70 75	
ACA GTC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC ACG GCC GTG	336
Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
80 85 90	
TAT TAC TGT GCG AGA GGA TTA CGA CGA GGG GGG TAC TAC TTT GAC TAC	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr	
95 100 105	
TGG GGG CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA G	418
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
110 115 120	

【0199】

配列番号：12

配列の長さ：418

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTC TTC TTC TTG CTG GCT GTA GCT CCA GGT	48
Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly	
-15 -10 -5	
GCT CAC TCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG	96
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
-1 1 5 10	
CCT GGG GCC TCA GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCA TCT GGA TAC ACC TTC	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
15 20 25	
ACT CCC TAC TGG ATG CAG TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT	192
Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
GAG TGG ATG GGA TCT ATT TTT CCT GGA GAT GGT GAT ACT AGG TAC AGT	240
Glu Trp Met Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser	
50 55 60	
CAG AAG TTC AAG GGC AAA GTC ACC ATG ACC GCA GAC ACG TCC ACG AGC	288
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser	
65 70 75	
ACA GTC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC ACG GCC GTG	336
Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
80 85 90	
TAT TAC TGT GCG AGA GGA TTA CGA CGA GGG GGG TAC TAC TTT GAC TAC	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr	
95 100 105	
TGG GGG CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA G	418
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
110 115 120	

【0200】

配列番号：13

配列の長さ：418

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTC TTC TTC TTG CTG GCT GTA GCT CCA GGT	48
Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly	
-15 -10 -5	
GCT CAC TCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG	96
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
-1 1 5 10	
CCT GGG GCC TCA GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCA TCT GGA TAC ACC TTC	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
15 20 25	
ACT CCC TAC TGG ATG CAG TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT	192
Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
GAG TGG ATG GGA TCT ATT TTT CCT GGA GAT GGT GAT ACT AGG TAC AGT	240
Glu Trp Met Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser	
50 55 60	
CAG AAG TTC AAG GGC AGA GTC ACT ATG ACC GCA GAC AAG TCC ACG AGC	288
Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser	
65 70 75	
ACA GTC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC ACG GCC GTG	336
Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
80 85 90	
TAT TAC TGT GCG AGA GGA TTA CGA CGA GGG GGG TAC TAC TTT GAC TAC	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr	
95 100 105	

TGG GGG CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA G 418

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

110 115 120

【0201】

配列番号：14

配列の長さ：418

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTC TTC TTC TTG CTG GCT GTA GCT CCA GGT 48

Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly

-15 -10 -5

GCT CAC TCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG 96

Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys

-1 1 5 10

CCT GGG GCC TCA GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCA TCT GGA TAC ACC TTC 144

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

15 20 25

ACT CCC TAC TGG ATG CAG TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT 192

Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

30 35 40 45

GAG TGG ATG GGA TCT ATT TTT CCT GGA GAT GGT GAT ACT AGG TAC AGT 240

Glu Trp Met Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser

50 55 60

CAG AAG TTC AAG GGC AAA GTC ACC ATG ACC GCA GAC AAG TCC ACG AGC 288

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Val Thr Met Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser

65 70 75

ACA GTC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC ACG GCC GTG 336  
Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val

80

85

90

TAT TAC TGT GCG AGA GGA TTA CGA CGA GGG GGG TAC TAC TTT GAC TAC 384  
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr

95

100

105

TGG GGG CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA G 418  
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

110

115

120

【0202】

配列番号：15

配列の長さ：418

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTC TTC TTC TTG CTG GCT GTA GCT CCA GGT 48  
Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly

-15

-10

-5

GCT CAC TCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG 96  
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys

-1 1

5

10

CCT GGG GCC TCA GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCA TCT GGA TAC ACC TTC 144  
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

15

20

25

ACT CCC TAC TGG ATG CAG TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT 192  
Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

30

35

40

45

GAG TGG ATG GGA TCT ATT TTT CCT GGA GAT GGT GAT ACT AGG TAC AGT	240
Glu Trp Met Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser	
50 55 60	
CAG AAG TTC AAG GGC AGA GCC ACC CTG ACC GCA GAC ACG TCC ACG AGC	288
Gln Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser	
65 70 75	
ACA GTC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC ACG GCC GTG	336
Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
80 85 90	
TAT TAC TGT GCG AGA GGA TTA CGA CGA GGG GGG TAC TAC TTT GAC TAC	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr	
95 100 105	
TGG GGG CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA G	418
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
110 115 120	

【0203】

配列番号：16

配列の長さ：418

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTC TTC TTC TTG CTG GCT GTA GCT CCA GGT	48
Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly	
-15 -10 -5	
GCT CAC TCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG	96
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
-1 1 5 10	



CCT GGG GCC TCA GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCA TCT GGA TAC ACC TTC	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
15 20 25	
ACT CCC TAC TGG ATG CAG TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT	192
Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
GAG TGG ATG GGA TCT ATT TTT CCT GGA GAT GGT GAT ACT AGG TAC AGT	240
Glu Trp Met Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser	
50 55 60	
CAG AAG TTC AAG GGC AGA GCC ACC CTG ACT GCA GAC ACG TCC TCG AGC	288
Gln Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser	
65 70 75	
ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC ACG GCC GTG	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
80 85 90	
TAT TAC TGT GCG AGA GGA TTA CGA CGA GGG GGG TAC TAC TTT GAC TAC	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr	
95 100 105	
TGG GGG CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA G	418
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
110 115 120	

【0204】

配列番号：17

配列の長さ：418

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTC TTC TTC TTG CTG GCT GTA GCT CCA GGT	48
Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly	
-15 -10 -5	
GCT CAC TCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG	96
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
-1 1 5 10	
CCT GGG GCC TCA GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCA TCT GGA TAC ACC TTC	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
15 20 25	
ACT CCC TAC TGG ATG CAG TGG GTG CGA CAG CGC CCT GGA CAA GGG CTT	192
Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
GAG TGG ATG GGA TCT ATT TTT CCT GGA GAT GGT GAT ACT AGG TAC AGT	240
Glu Trp Met Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser	
50 55 60	
CAG AAG TTC AAG GGC AGA GTC ACC ATG ACC GCA GAC ACG TCC ACG AGC	288
Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser	
65 70 75	
ACA GTC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC ACG GCC GTG	336
Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
80 85 90	
TAT TAC TGT GCG AGA GGA TTA CGA CGA GGG GGG TAC TAC TTT GAC TAC	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr	
95 100 105	
TGG GGG CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA G	418
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
110 115 120	

【0205】

配列番号：18

配列の長さ：418

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTC TTC TTC TTG CTG GCT GTA GCT CCA GGT	48
Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly	
-15 -10 -5	
GCT CAC TCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG	96
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
-1 1 5 10	
CCT GGG GCC TCA GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCA TCT GGA TAC ACC TTC	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
15 20 25	
ACT CCC TAC TGG ATG CAG TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT	192
Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
GAG TGG ATG GGA TCT ATT TTT CCT GGA GAT GGT GAT ACT AGG TAC AGT	240
Glu Trp Met Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser	
50 55 60	
CAG AAG TTC AAG GGC AAA GTC ACC ATG ACC GCA GAC ACG TCC TCG AGC	288
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser	
65 70 75	
ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC ACG GCC GTG	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
80 85 90	
TAT TAC TGT GCG AGA GGA TTA CGA CGA GGG GGG TAC TAC TTT GAC TAC	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr	
95 100 105	

TGG GGG CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA G 418  
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 110 115 120

【0206】

配列番号：19

配列の長さ：418

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTC TTC TTC TTG CTG GCT GTA GCT CCA GGT 48  
 Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly  
 -15 -10 -5

GCT CAC TCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG 96  
 Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
 -1 1 5 10

CCT GGG GCC TCA GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCA TCT GGA TAC ACC TTC 144  
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 15 20 25

ACT CCC TAC TGG ATG CAG TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT 192  
 Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
 30 35 40 45

GAG TGG ATG GGA TCT ATT TTT CCT GGA GAT GGT GAT ACT AGG TAC AGT 240  
 Glu Trp Met Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser  
 50 55 60

CAG AAG TTC AAG GGC AAA GTC ACC ATG ACC GCA GAC ACG TCC TCG AGC 288  
 Gln Lys Phe Lys Gly Lys Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser  
 65 70 75

ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG GCA TTT GAG GAC ACG GCC GTG 336  
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Ala Phe Glu Asp Thr Ala Val

80 85 90

TAT TAC TGT GCG AGA GGA TTA CGA CGA GGG GGG TAC TAC TTT GAC TAC 384  
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr

95 100 105

TGG GGG CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA G 418  
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

110 115 120

【0207】

配列番号：20

配列の長さ：418

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTC TTC TTC TTG CTG GCT GTA GCT CCA GGT 48  
Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly

-15 -10 -5

GCT CAC TCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG 96  
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys

-1 1 5 10

CCT GGG GCC TCA GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCA TCT GGA TAC ACC TTC 144  
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

15 20 25

ACT CCC TAC TGG ATG CAG TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT 192  
Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

30 35 40 45

GAG TGG ATG GGA TCT ATT TTT CCT GGA GAT GGT GAT ACT AGG TAC AGT	240
Glu Trp Met Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser	
50 55 60	
CAG AAG TTC AAG GGC AAA GCC ACC CTG ACT GCA GAC ACG TCC TCG AGC	288
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser	
65 70 75	
ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC ACG GCC GTG	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
80 85 90	
TAT TAC TGT GCG AGA GGA TTA CGA CGA GGG GGG TAC TAC TTT GAC TAC	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr	
95 100 105	
TGG GGG CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA G	418
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
110 115 120	

【0208】

配列番号：21

配列の長さ：418

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTC TTC TTC TTG CTG GCT GTA GCT CCA GGT	48
Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly	
-15 -10 -5	
GCT CAC TCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG	96
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
-1 1 5 10	

CCT GGG GCC TCA GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCA TCT GGA TAC ACC TTC	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
15 20 25	
ACT CCC TAC TGG ATG CAG TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT	192
Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
GAG TGG ATG GGA TCT ATT TTT CCT GGA GAT GGT GAT ACT AGG TAC AGT	240
Glu Trp Met Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser	
50 55 60	
CAG AAG TTC AAG GGC AAA GTC ACC ATG ACC GCA GAC ACG TCC TCG AGC	288
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser	
65 70 75	
ACA GCC TAC ATG CAG CTG AGC AGC CTA AGA TCT GAG GAC ACG GCC GTG	336
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
80 85 90	
TAT TAC TGT GCG AGA GGA TTA CGA CGA GGG GGG TAC TAC TTT GAC TAC	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr	
95 100 105	
TGG GGG CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA G	418
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
110 115 120	

【0209】

配列番号：22

配列の長さ：418

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTC TTC TTC TTG CTG GCT GTA GCT CCA GGT	48
Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly	
-15 -10 -5	
GCT CAC TCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG	96
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
-1 1 5 10	
CCT GGG GCC TCA GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCA TCT GGA TAC ACC TTC	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
15 20 25	
ACT CCC TAC TGG ATG CAG TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT	192
Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
GAG TGG ATG GGA TCT ATT TTT CCT GGA GAT GGT GAT ACT AGG TAC AGT	240
Glu Trp Met Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser	
50 55 60	
CAG AAG TTC AAG GGC AAA GTC ACC ATG ACC GCA GAC ACG TCC TCG AGC	288
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser	
65 70 75	
ACA GCC TAC ATG CAG CTG AGC ATC CTG AGA TCT GAG GAC ACG GCC GTG	336
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ile Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
80 85 90	
TAT TAC TGT GCG AGA GGA TTA CGA CGA GGG GGG TAC TAC TTT GAC TAC	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr	
95 100 105	
TGG GGG CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA G	418
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
110 115 120	

【0210】

配列番号：23



配列の長さ：418

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTC TTC TTC TTG CTG GCT GTA GCT CCA GGT	48
Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly	
-15 -10 -5	
GCT CAC TCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG	96
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
-1 1 5 10	
CCT GGG GCC TCA GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCA TCT GGA TAC ACC TTC	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
15 20 25	
ACT CCC TAC TGG ATG CAG TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT	192
Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
GAG TGG ATG GGA TCT ATT TTT CCT GGA GAT GGT GAT ACT AGG TAC AGT	240
Glu Trp Met Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser	
50 55 60	
CAG AAG TTC AAG GGC AAA GTC ACC ATG ACC GCA GAC ACG TCC TCG AGC	288
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser	
65 70 75	
ACA GCC TAC ATG CAG CTG AGC ATC CTG AGA TCT GAG GAC TCG GCC GTG	336
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ile Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val	
80 85 90	
TAT TAC TGT GCG AGA GGA TTA CGA CGA GGG GGG TAC TAC TTT GAC TAC	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr	
95 100 105	

TGG GGG CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA G 418  
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 110 115 120

【0211】

配列番号：24

配列の長さ：418

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTC TTC TTC TTG CTG GCT GTA GCT CCA GGT 48  
 Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly  
 -15 -10 -5

GCT CAC TCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG 96  
 Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
 -1 1 5 10

CCT GGG GCC TCA GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCA TCT GGA TAC ACC TTC 144  
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 15 20 25

ACT CCC TAC TGG ATG CAG TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT 192  
 Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
 30 35 40 45

GAG TGG ATG GGA TCT ATT TTT CCT GGA GAT GGT GAT ACT AGG TAC AGT 240  
 Glu Trp Met Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser  
 50 55 60

CAG AAG TTC AAG GGC AAA GTC ACC ATG ACC GCA GAC ACG TCC TCG AGC 288  
 Gln Lys Phe Lys Gly Lys Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser  
 65 70 75

ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC ATC CTG AGA TCT GAG GAC ACG GCC GTG 336  
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ile Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val

80 85 90

TAT TAC TGT GCG AGA GGA TTA CGA CGA GGG GGG TAC TAC TTT GAC TAC 384  
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr

95 100 105

TGG GGG CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA G 418  
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

110 115 120

【0212】

配列番号：25

配列の長さ：418

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTC TTC TTC TTG CTG GCT GTA GCT CCA GGT 48  
Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly

-15 -10 -5

GCT CAC TCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG 96  
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys

-1 1 5 10

CCT GGG GCC TCA GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCA TCT GGA TAC ACC TTC 144  
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

15 20 25

ACT CCC TAC TGG ATG CAG TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT 192  
Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

30 35 40 45

GAG TGG ATG GGA TCT ATT TTT CCT GGA GAT GGT GAT ACT AGG TAC AGT	240
Glu Trp Met Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser	
50 55 60	
CAG AAG TTC AAG GGC AAA GTC ACC ATG ACC GCA GAC ACG TCC TCG AGC	288
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser	
65 70 75	
ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC TCG GCC GTA	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val	
80 85 90	
TAT TAC TGT GCG AGA GGA TTA CGA CGA GGG GGG TAC TAC TTT GAC TAC	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr	
95 100 105	
TGG GGG CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA G	418
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
110 115 120	

【0213】

配列番号：26

配列の長さ：418

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTC TTC TTC TTG CTG GCT GTA GCT CCA GGT	48
Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly	
-15 -10 -5	
GCT CAC TCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG	96
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
-1 1 5 10	

CCT GGG GCC TCA GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCA TCT GGA TAC ACC TTC	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
15 20 25	
ACT CCC TAC TGG ATG CAG TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT	192
Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
GAG TGG ATG GGA TCT ATT TTT CCT GGA GAT GGT GAT ACT AGG TAC AGT	240
Glu Trp Met Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser	
50 55 60	
CAG AAG TTC AAG GGC AGA GTC ACC ATG ACC GCA GAC ACG TCC ACG AGC	288
Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser	
65 70 75	
ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC ACG GCC GTG	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
80 85 90	
TAT TAC TGT GCG AGA GGA TTA CGA CGA GGG GGG TAC TAC TTT GAC TAC	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr	
95 100 105	
TGG GGG CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA G	418
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
110 115 120	

【0214】

配列番号：27

配列の長さ：418

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTC TTC TTC TTG CTG GCT GTA GCT CCA GGT	48
Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly	
-15 -10 -5	
GCT CAC TCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG	96
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
-1 1 5 10	
CCT GGG GCC TCA GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCA TCT GGA TAC ACC TTC	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
15 20 25	
ACT CCC TAC TGG ATG CAG TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT	192
Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
GAG TGG ATG GGA TCT ATT TTT CCT GGA GAT GGT GAT ACT AGG TAC AGT	240
Glu Trp Met Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser	
50 55 60	
CAG AAG TTC AAG GGC AGA GTC ACC ATG ACC GCA GAC ACG TCC TCG AGC	288
Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser	
65 70 75	
ACA GTC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC ACG GCC GTG	336
Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
80 85 90	
TAT TAC TGT GCG AGA GGA TTA CGA CGA GGG GGG TAC TAC TTT GAC TAC	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr	
95 100 105	
TGG GGG CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA G	418
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
110 115 120	

【0215】

配列番号：28

配列の長さ : 418

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

配列

ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTC TTC TTC TTG CTG GCT GTA GCT CCA GGT	48
Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly	
-15 -10 -5	
GCT CAC TCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG	96
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
-1 1 5 10	
CCT GGG GCC TCA GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCA TCT GGA TAC ACC TTC	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
15 20 25	
ACT CCC TAC TGG ATG CAG TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT	192
Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
GAG TGG ATG GGA TCT ATT TTT CCT GGA GAT GGT GAT ACT AGG TAC AGT	240
Glu Trp Met Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser	
50 55 60	
CAG AAG TTC AAG GGC AGA GTC ACC ATG ACC GCA GAC AAG TCC ACG AGC	288
Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser	
65 70 75	
ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC ACG GCC GTG	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
80 85 90	
TAT TAC TGT GCG AGA GGA TTA CGA CGA GGG GGG TAC TAC TTT GAC TAC	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr	
95 100 105	

TGG GGG CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA G

418

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

110

115

120

【0216】

配列番号：29

配列の長さ：40

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGAAGTTGC CTGTTAGGCT GTTGGTGCTG

40

【0217】

配列番号：30

配列の長さ：39

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGAGWCAG ACACACTCCT GYTATGGGT

39

【0218】

配列番号：31

配列の長さ：40

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGAGTGTGC TCACTCAGGT CCTGGS GTTG

40

【0219】

配列番号：32



配列の長さ：43

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGAGGRCCC CTGCTCAGWT TYTTGGMWTC TTG

43

【0220】

配列番号：33

配列の長さ：40

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGATTTWC AGGTGCAGAT TWTGAGCTTC

40

【0221】

配列番号：34

配列の長さ：37

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGAGGTKCY YTGYSAGYT YCTGRGG

37

【0222】

配列番号：35

配列の長さ：41

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGGCWTCA AGATGGAGTC ACAKWYYCWG G

41

【0223】

配列番号：36

配列の長さ：41

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGTGGGGAY CTKTTTYCMM TTTTCAATT G

41

【0224】

配列番号：37

配列の長さ：35

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGTRTCCW CASCTCAGTT CCTTG

35

【0225】

配列番号：38

配列の長さ：37

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGTATATAT GTTGTTGTC TATTTCT

37

【0226】

配列番号：39

配列の長さ：38

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGAAGCCC CAGCTCAGCT TCTCTTCC

38

【0227】

配列番号：40

配列の長さ：27

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GGATCCCGGG TGGATGGTGG GAAGATG

27

【0228】

配列番号：41

配列の長さ：25

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

TAGAGTCACC GAGGAGCCAG TTGTA

25

【0229】

配列番号：42

配列の長さ：26

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GGATCCCGGG AGTGGATAGA CCGATG

26

【0230】

配列番号：43

配列の長さ：34

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GATAAGCTTC CACCATGGGC TTCAAGATGG AGTC

34

【0231】

配列番号：44

配列の長さ：34

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GATAAGCTTC CACCATGGAA TGTAAGTGA TACT

34

【0232】

配列番号：45

配列の長さ：34

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GGCGGATCCA CTCACGTTTT ATTCCTCAACT TTGT

34

【0233】

配列番号：46

配列の長さ：34

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GGCGGATCCA CTCACCTGAG GAGACTGTGA GAGT

34

【0234】

配列番号：47

配列の長さ：18

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

CAGACAGTGG TTCAAAGT

18

【0235】

配列番号：48

配列の長さ：26

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GAATTCGGAT CCACTCACGT TTGATT

26

【0236】

配列番号：49

配列の長さ：48

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

AGTCAGGATG TGAATACTGC TGTAGCCTGG TACCAGCAGA AGCCAGGA

48

【0237】

配列番号：50

配列の長さ：39

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GCATCCAACC GGTACACTGG TGTGCCAAGC AGATTTCAGC

39

【0238】

配列番号：51

配列の長さ：45

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

CAACATTATA GTACTCCATT CACGTTTCGGC CAAGGGACCA AGGTG

45

【0239】

配列番号：52

配列の長さ：47

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GCAGTATTCA CATCCTGACT GGCCTTACAG GTGATGGTCA CTCTGTC

47

【0240】

配列番号：53

配列の長さ：38

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACACCAGTGT ACCGGTTGGA TGCCGAGTAG ATCAGCAG

38

【0241】

配列番号：54

配列の長さ：41

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GTGAATGGAG TACTATAATG TTGCTGGCAG TAGTAGGTAG C

41

【0242】

配列番号：55

配列の長さ：31

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GGTACCGACT ACACCTTCAC CATCAGCAGC C

31

【0243】

配列番号：56

配列の長さ：31

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GGTGAAGGTG TAGTCGGTAC CGCTACCGCT A

31

【0244】

配列番号：57

配列の長さ：144

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ATGCCTTGCA GGAAACCTTC ACTGAGGCC CAGGCTTCTT CACCTCAGCC CCAGACTGCA 60  
CCAGCTGCAC CTGGGAGTGA GCACCTGGAG CTACAGCCAG CAAGAAGAAG ACCCTCCAGG 120  
TCCAGTCCAT GGTGGAAGCT TATC 144

【0245】

配列番号：58

配列の長さ：130

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

TCAGTGAAGG TTTCCTGCAA GGCATCTGGA TACACCTTCA CTCCTACTG GATGCAGTGG 60  
GTGCGACAGG CCCCTGGACA AGGGCTTGAG TGGATGGGAT CTATTTTCC TGGAGATGGT 120  
GATACTAGGT 130

【0246】

配列番号：59

配列の長さ：131

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

AATACACGGC CGTGTCTCA GATCTCAGGC TGCTCAGCTC CATGTAGACT GTGCTCGTGG 60  
ACGTGTCTGC GGTCATGGTG ACTCTGCCCT TGAATTCTG ACTGTACCTA GTATCACCAT 120  
CTCCAGGAAA A 131

【0247】

配列番号：60

配列の長さ：119

配列の型：核酸



トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GAGATCTGAG GACACGGCCG TGTATTACTG TGCGAGAGGA TTACGACGAG GGGGGTACTA 60

CTTTGACTAC TGGGGGCAAG GGACCACGGT CACCGTCTCC TCAGGTGAGT GGATCCGAC 119

【0248】

配列番号：61

配列の長さ：25

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GATAAGCTTC CACCATGGAC TGGAC 25

【0249】

配列番号：62

配列の長さ：25

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GTCGGATCCA CTCACCTGAG GAGAC 25

【0250】

配列番号：63

配列の長さ：26

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

AAGTTCAAGG GCAAAGTCAC CATGAC 26

【0251】

配列番号：64

配列の長さ：26

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GTCATGGTGA CTTTGCCCTT GAACTT

26

【0252】

配列番号：65

配列の長さ：26

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ATGACCGCAG ACAAGTCCAC GAGCAC

26

【0253】

配列番号：66

配列の長さ：26

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GTGCTCGTGG ACTTGTCTGC GGTCAT

26

【0254】

配列番号：67

配列の長さ：46

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

AAGTTCAAGG GCAAAGTCAC CATGACCGCA GACAAGTCCA CGAGCAC

46

【0255】

配列番号：68

配列の長さ：47

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GTGCTCGTGG ACTTGTCTGC GGTCATGGTG ACTTTGCCCT TGAACCT

47

【0256】

配列番号：69

配列の長さ：38

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

AAGTTCAAGG GCAGAGCCAC CCTGACCGCA GACACGTC

38

【0257】

配列番号：70

配列の長さ：38

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GACGTGTCTG CGGTCAGGGT GGCTCTGCCC TTGAACCT

38

【0258】

配列番号：71

配列の長さ：18

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

CAGACAGTGG TTCAAAGT

18

【0259】

配列番号：72

配列の長さ：17

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GCCCCAAAGC CAAGGTC

17

【0260】

配列番号：73

配列の長さ：23

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ATTTTTCCTG GAGATGGTGA TAC

23

【0261】

配列番号：74

配列の長さ：23

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GTATCACCAT CTCCAGGAAA TAT

23

【0262】

配列番号：75

配列の長さ：418

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

ATG GAA TGT AAC TGG ATA CTT CCT TTT ATT CTG TCA GTA ACT TCA GGT	48
Met Glu Cys Asn Trp Ile Leu Pro Phe Ile Leu Ser Val Thr Ser Gly	
-15 -10 -5	
GCC TAC TCA CAG GTT CAA CTC CAG CAG TCT GGG GCT GAG CTG GCA AGA	96
Ala Tyr Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg	
-1 1 5 10	
CCT GGG GCT TCA GTG AAG TTG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTT	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
15 20 25	
ACT CCC TAC TGG ATG CAG TGG GTA AAA CAG AGG CCT GGA CAG GGT CTG	192
Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
GAA TGG ATT GGG TCT ATT TTT CCT GGA GAT GGT GAT ACT AGG TAC AGT	240
Glu Trp Ile Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser	
50 55 60	
CAG AAG TTC AAG GGC AGA GTC ACC ATG ACC GCA GAC ACG TCC ACG AGC	288
Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser	
65 70 75	
ACA GTC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC ACG GCC GTG	336
Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
80 85 90	

TAT TAC TGT GCG AGA GGA TTA CGA CGA GGG GGG TAC TAC TTT GAC TAC 384  
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr

95 100 105

TGG GGG CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA G 418  
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

110 115 120

【0263】

配列番号：76

配列の長さ：418

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTC TTC TTC TTG CTG GCT GTA GCT CCA GGT 48  
Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly

-15 -10 -5

GCT CAC TCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG 96  
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys

-1 1 5 10

CCT GGG GCC TCA GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCA TCT GGA TAC ACC TTC 144  
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

15 20 25

ACT CCC TAC TGG ATG CAG TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT 192  
Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

30 35 40 45

GAG TGG ATG GGA TCT ATT TTT CCT GGA GAT GGT GAT ACT AGG TAC AGT 240  
Glu Trp Met Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser

50 55 60

CAG AAG TTC AAG GGC AAG GCC ACA TTG ACT GCA GAT AAA TCC TCC AGT 288  
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser

65

70

75

ACA GCC TAC ATG CAA CTC AGC ATC TTG GCA TTT GAG GAC TCT GCG GTC 336  
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ile Leu Ala Phe Glu Asp Ser Ala Val

80

85

90

TAT TAC TGT GCA AGA GGA TTA CGA CGA GGG GGG TAC TAC TTT GAC TAC 384  
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr

95

100

105

TGG GGC CAA GGC ACC ACT CTC ACA GTC TCC TCA G 418  
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

110

115

120

【0264】

配列番号：77

配列の長さ：38

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

CTGGTTCGGC CCACCTCTGA AGGTTCCAGA ATCGATAG 38

【0265】

配列番号：78

配列の長さ：35

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GCAGACACGT CCTCGAGCAC AGCCTACATG GAGCT 35

【0266】

配列番号 : 79

配列の長さ : 35

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

AGCTCCATGT AGGCTGTGCT CGAGGACGTG TCTGC

35

【0267】

配列番号 : 80

配列の長さ : 26

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

TGGGTGCGAC AGCGCCCTGG ACAAGG

26

【0268】

配列番号 : 81

配列の長さ : 26

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

CCTTGTCAG GCGCTGTCG CACCCA

26

【0269】

配列番号 : 82

配列の長さ : 41

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA



配列

TACATGGAGC TGAGCAGCCT GGCATTTGAG GACACGGCCG T

41

【0270】

配列番号：83

配列の長さ：41

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACGGCCGTGT CCTCAAATGC CAGGCTGCTC AGCTCCATGT A

41

【0271】

配列番号：84

配列の長さ：26

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

AAGTTCAAGG GCAAAGCCAC CCTGAC

26

【0272】

配列番号：85

配列の長さ：26

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GTCAGGGTGG CTTTGCCCTT GAACTT

26

【0273】

配列番号：86

配列の長さ：23

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GCCTACATGC AGCTGAGCAG CCT

23

【0274】

配列番号：87

配列の長さ：23

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

AGGCTGCTCA GCTGCATGTA GGC

23

【0275】

配列番号：88

配列の長さ：38

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GCCTACATGC AGCTGAGCAT CCTGAGATCT GAGGACAC

38

【0276】

配列番号：89

配列の長さ：35

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GATCTCAGGA TGCTCAGCTG CATGTAGGCT GTGCT

35

【0277】

配列番号：90

配列の長さ：50

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GCCTACATGC AGCTGAGCAT CCTGAGATCT GAGGACTCGG CCGTGTATTA 50

【0278】

配列番号：91

配列の長さ：50

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACGGCCGAGT CCTCAGATCT CAGGATGCTC AGCTGCATGT AGGCTGTGCT 50

【0279】

配列番号：92

配列の長さ：20

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GAGCTGAGCA TCCTGAGATC 20

【0280】

配列番号：93

配列の長さ：26

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GATCTCAGGA TGCTCAGCTC CATGTA

26

【0281】

配列番号：94

配列の長さ：20

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

AGATCTGAGG ACTCGGCCGT

20

【0282】

配列番号：95

配列の長さ：20

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACGGCCGAGT CCTCAGATCT

20

【0283】

配列番号：96

配列の長さ：35

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GCAGACACGT CCACGAGCAC AGCCTACATG GAGCT

35

【0284】

配列番号：97

配列の長さ：35

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

AGCTCCATGT AGGCTGTGCT CGTGGACGTG TCTGC

35

【0285】

配列番号：98

配列の長さ：35

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GCAGACACGT CCTCGAGCAC AGTCTACATG GAGCT

35

【0286】

配列番号：99

配列の長さ：35

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

AGCTCCATGT AGACTGTGCT CGAGGACGTG TCTGC

35

【0287】

配列番号：100

配列の長さ：26

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

AGAGTCACCA TCACCGCAGA CAAGTC

26

【0288】

配列番号：101

配列の長さ：26

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GACTTGTCTG CGGTGATGGT GACTCT

26

【0289】

配列番号：102

配列の長さ：418

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTC TTC TTC TTG CTG GCT GTA GCT CCA GGT 48

Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly

-15

-10

-5

GCT CAC TCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG 96

Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys

-1 1

5

10

CCT GGG GCC TCA GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCA TCT GGA TAC ACC TTC 144

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

15

20

25

ACT CCC TAC TGG ATG CAG TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT 192

Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

30

35

40

45

GAG TGG ATG GGA TCT ATT TTT CCT GGA GAT GGT GAT ACT AGG TAC AGT	240
Glu Trp Met Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser	
50 55 60	
CAG AAG TTC AAG GGC AGA GTC ACC ATC ACC GCA GAC AAG TCC ACG AGC	288
Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser	
65 70 75	
ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC ACG GCC GTG	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
80 85 90	
TAT TAC TGT GCG AGA GGA TTA CGA CGA GGG GGG TAC TAC TTT GAC TAC	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr	
95 100 105	
TGG GGG CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA G	418
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
110 115 120	

【0290】

配列番号：103

配列の長さ：1013

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

GAATTCGGCA CGAGGGATCT GG ATG GCA TCT ACT TCG TAT GAC TAT TGC	49
Met Ala Ser Thr Ser Tyr Asp Tyr Cys	
1 5	
AGA GTG CCC ATG GAA GAC GGG GAT AAG CGC TGT AAG CTT CTG CTG GGG	97
Arg Val Pro Met Glu Asp Gly Asp Lys Arg Cys Lys Leu Leu Leu Gly	
10 15 20 25	

ATA GGA ATT CTG GTG CTC CTG ATC ATC GTG ATT CTG GGG GTG CCC TTG	145
Ile Gly Ile Leu Val Leu Leu Ile Ile Val Ile Leu Gly Val Pro Leu	
30 35 40	
ATT ATC TTC ACC ATC AAG GCC AAC AGC GAG GCC TGC CGG GAC GGC CTT	193
Ile Ile Phe Thr Ile Lys Ala Asn Ser Glu Ala Cys Arg Asp Gly Leu	
45 50 55	
CGG GCA GTG ATG GAG TGT CGC AAT GTC ACC CAT CTC CTG CAA CAA GAG	241
Arg Ala Val Met Glu Cys Arg Asn Val Thr His Leu Leu Gln Gln Glu	
60 65 70	
CTG ACC GAG GCC CAG AAG GGC TTT CAG GAT GTG GAG GCC CAG GCC GCC	289
Leu Thr Glu Ala Gln Lys Gly Phe Gln Asp Val Glu Ala Gln Ala Ala	
75 80 85	
ACC TGC AAC CAC ACT GTG ATG GCC CTA ATG GCT TCC CTG GAT GCA GAG	337
Thr Cys Asn His Thr Val Met Ala Leu Met Ala Ser Leu Asp Ala Glu	
90 95 100 105	
AAG GCC CAA GGA CAA AAG AAA GTG GAG GAG CTT GAG GGA GAG ATC ACT	385
Lys Ala Gln Gly Gln Lys Lys Val Glu Glu Leu Glu Gly Glu Ile Thr	
110 115 120	
ACA TTA AAC CAT AAG CTT CAG GAC GCG TCT GCA GAG GTG GAG CGA CTG	433
Thr Leu Asn His Lys Leu Gln Asp Ala Ser Ala Glu Val Glu Arg Leu	
125 130 135	
AGA AGA GAA AAC CAG GTC TTA AGC GTG AGA ATC GCG GAC AAG AAG TAC	481
Arg Arg Glu Asn Gln Val Leu Ser Val Arg Ile Ala Asp Lys Lys Tyr	
140 145 150	
TAC CCC AGC TCC CAG GAC TCC AGC TCC GCT GCG GCG CCC CAG CTG CTG	529
Tyr Pro Ser Ser Gln Asp Ser Ser Ser Ala Ala Ala Pro Gln Leu Leu	
155 160 165	



ATT GTG CTG CTG GGC CTC AGC GCT CTG CTG CAG TGA GATCCCAGGA 575  
 Ile Val Leu Leu Gly Leu Ser Ala Leu Leu Gln \*\*\*  
 170 175 180  
 AGCTGGCACA TCTTGGAAGG TCCGTCCTGC TCGGCTTTTC GCTTGAACAT TCCCTTGATC 635  
 TCATCAGTTC TGAGCGGGTC ATGGGGCAAC ACGGTAGCG GGGAGAGCAC GGGGTAGCCG 695  
 GAGAAGGGCC TCTGGAGCAG GTCTGGAGGG GCCATGGGGC AGTCCTGGGT CTGGGGACAC 755  
 AGTCGGGTTG ACCCAGGGCT GTCTCCCTCC AGAGCCTCCC TCCGGACAAT GAGTCCCCCC 815  
 TCTTGTCTCC CACCCTGAGA TTGGGCATGG GGTGCGGTGT GGGGGGCATG TGCTGCCTGT 875  
 TGTTATGGGT TTTTTTGGC GGGGGGGTTG CTTTTTCTG GGGTCTTTGA GCTCCAAAAA 935  
 AATAAACACT TCCTTTGAGG GAGAGCACAC CTAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 995  
 AAAATTGCGG CGGCCGCC 1013

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、ヒト骨髓腫細胞株KPM2 を用いたFCM 解析において、キメラ抗HM1.24 抗体の蛍光強度がマウス抗HM1.24抗体の蛍光強度と同様に、コントロール抗体に比べシフトしていることを示すグラフである。

【図 2】

図 2 は、WISH細胞を用いたCell-ELISAにおいて、キメラ抗HM1.24抗体はマウス抗HM1.24抗体と同様に、ビオチン化マウス抗HM1.24抗体のWISH細胞への結合を濃度依存的阻害していることを示すグラフである。

【図 3】

図 3 は、コントロールヒトIgG1、あるいはマウス抗HM1.24抗体は、RPMI8226細胞に対する細胞障害活性を持たないのに対し、キメラ抗HM1.24抗体はE/T 比の上昇に伴い、RPMI 8226 細胞に対する細胞障害活性が上昇していることを示すグラフである。

【図 4】

図 4 は、PCR 法によるCDR グラフティングにより再構成ヒト抗HM1.24抗体L 鎖を、作製する方法を示す模式図である。

【図 5】

図 5 は、再構成ヒト抗HM1.24抗体H 鎖の作製において、PCR 法によりRVH1、RVH2、RVH3及びRVH4のオリゴヌクレオチドをアセンブリーする方法を示す模式図である。

【図 6】

図 6 は、PCR 法によりヒト・マウスハイブリッド抗HM1.24抗体H 鎖V 領域を作製する方法を示す模式図である。

【図 7】

図 7 は、PCR 法によりマウス・ヒトハイブリッド抗HM1.24抗体H 鎖V 領域を作製する方法を示す模式図である。

【図 8】

図 8 は、再構成ヒト抗HM1.24抗体L 鎖バージョン a はキメラ抗HM1.24抗体と同

程度の抗原結合活性を有することを示すグラフである。なお、-1, -2はロットの違いを示す。

【図9】

図9は、L鎖バージョンaとH鎖バージョンa、b、f又はhを組み合わせた再構成ヒト抗HM1.24抗体およびキメラ抗体HM1.24抗体の抗原結合活性を示すグラフである。

【図10】

図10は、L鎖バージョンbとH鎖バージョンa、b、f又はhを組み合わせた再構成ヒト抗HM1.24抗体およびキメラ抗体HM1.24抗体の結合活性を示すグラフである。

【図11】

図11は、L鎖バージョンaとH鎖バージョンa、b、f又はhを組み合わせた再構成ヒト抗HM1.24抗体およびキメラ抗体HM1.24抗体の結合阻害活性を示すグラフである。

【図12】

図12は、L鎖バージョンbとH鎖バージョンa、b、f又はhを組み合わせた再構成ヒト抗HM1.24抗体およびキメラ抗体HM1.24抗体の結合阻害活性を示すグラフである。

【図13】

図13は、再構成ヒト抗HM1.24抗体H鎖バージョンa、b、c、d及びキメラ抗HM1.24抗体の抗原結合活性を示すグラフである。

【図14】

図14は、再構成ヒト抗HM1.24抗体H鎖バージョンa、e及びキメラ抗HM1.24抗体の抗原結合活性を示すグラフである。なお、-1, -2はロットの違いを示す。

【図15】

図15は、再構成ヒト抗HM1.24抗体H鎖バージョンa、c、p、r及びキメラ抗HM1.24抗体の結合阻害活性を示すグラフである。

【図16】

図16は、ヒト・マウスハイブリッド抗HM1.24抗体、マウス・ヒトハイブリッ

ド抗HM1.24抗体およびキメラ抗HM1.24抗体の抗原結合活性を示すグラフである。

【図17】

図17は、再構成ヒト抗HM1.24抗体H鎖バージョンa、b、c、f及びキメラ抗HM1.24抗体の抗原結合活性を示すグラフである。

【図18】

図18は、再構成ヒト抗HM1.24抗体H鎖バージョンa、g及びキメラ抗HM1.24抗体の抗原結合活性を示すグラフである。

【図19】

図19は、再構成ヒト抗HM1.24抗体H鎖バージョンa、g及びキメラ抗HM1.24抗体の結合阻害活性を示すグラフである。

【図20】

図20は、再構成ヒト抗HM1.24抗体H鎖バージョンh、i及びキメラ抗HM1.24抗体の抗原結合活性を示すグラフである。

【図21】

図21は、再構成ヒト抗HM1.24抗体H鎖バージョンf、h、j及びキメラ抗HM1.24抗体の抗原結合活性を示す。

【図22】

図22は、再構成ヒト抗HM1.24抗体H鎖バージョンh、i及びキメラ抗HM1.24抗体の結合阻害活性を示すグラフである。

【図23】

図23は、再構成ヒト抗HM1.24抗体H鎖バージョンf、h、j及びキメラ抗HM1.24抗体の結合阻害活性を示すグラフである。

【図24】

図24は、再構成ヒト抗HM1.24抗体H鎖バージョンh、k、l、m、n、o及びキメラ抗HM1.24抗体の抗原結合活性を示すグラフである。

【図25】

図25は、再構成ヒト抗HM1.24抗体H鎖バージョンa、h、p、q及びキメラ抗HM1.24抗体の抗原結合活性を示すグラフである。

【図26】

図26は、再構成ヒト抗HM1.24抗体H鎖バージョンh、k、l、m、n、o及びキメラ抗HM1.24抗体のWISH細胞への結合阻害活性を示すグラフである。

【図27】

図27は、再構成ヒト抗HM1.24抗体H鎖バージョンa、h、p、q及びキメラ抗HM1.24抗体の結合阻害活性を示すグラフである。

【図28】

図28は、再構成ヒト抗HM1.24抗体H鎖バージョンa、c、p、r及びキメラ抗HM1.24抗体の抗原結合活性を示すグラフである。

【図29】

図29は、天然ヒト型化抗HM1.24抗体（二次デザイン抗体）が、再構成ヒト抗HM1.24抗体（一次デザイン抗体）と同程度の抗原結合活性を有することを示すグラフである。

【図30】

図30は、天然ヒト型化抗HM1.24抗体（二次デザイン抗体）が、再構成ヒト抗HM1.24抗体（一次デザイン抗体）と同程度の結合阻害活性を有することを示すグラフである。

【図31】

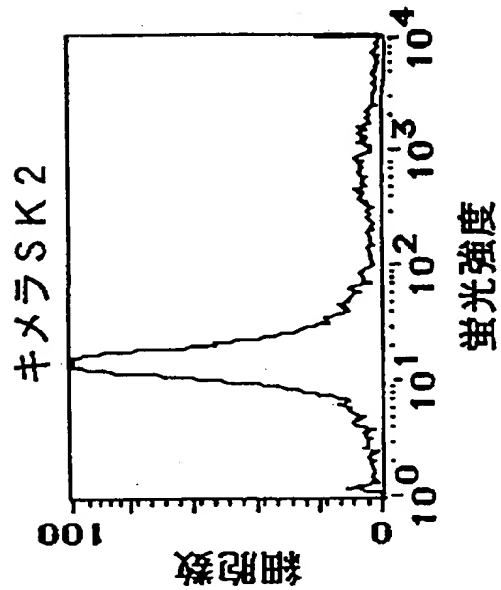
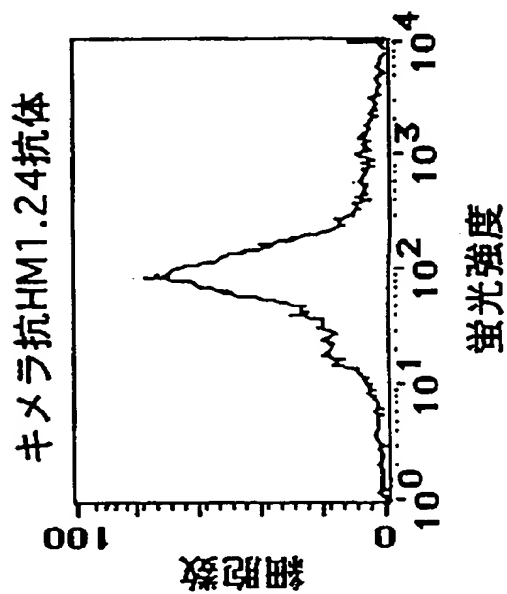
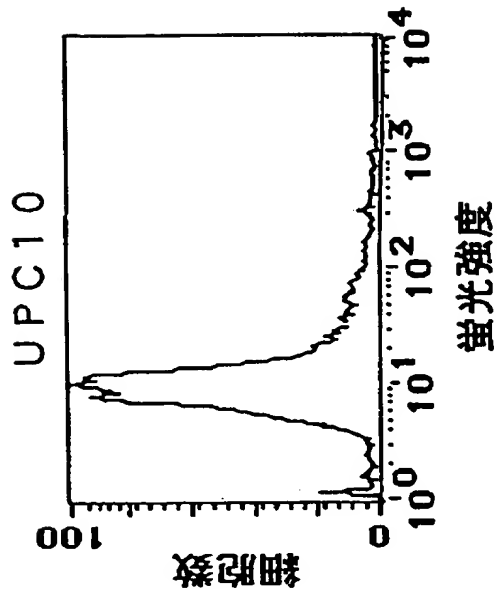
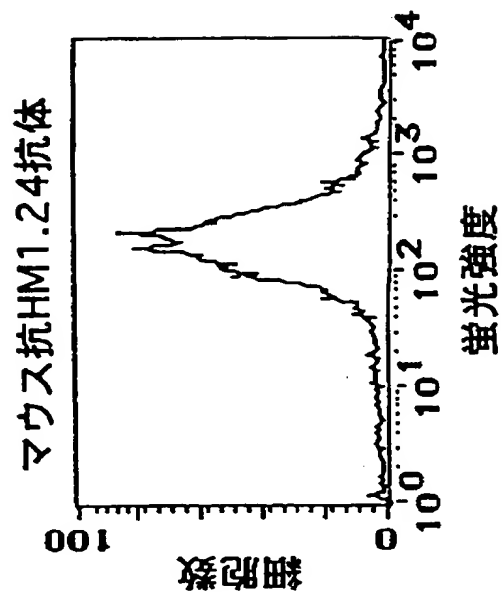
図31は、精製再構成ヒト抗HM1.24抗体は、キメラ抗HM1.24抗体と同程度の抗原結合活性を有することを示すグラフである。

【図32】

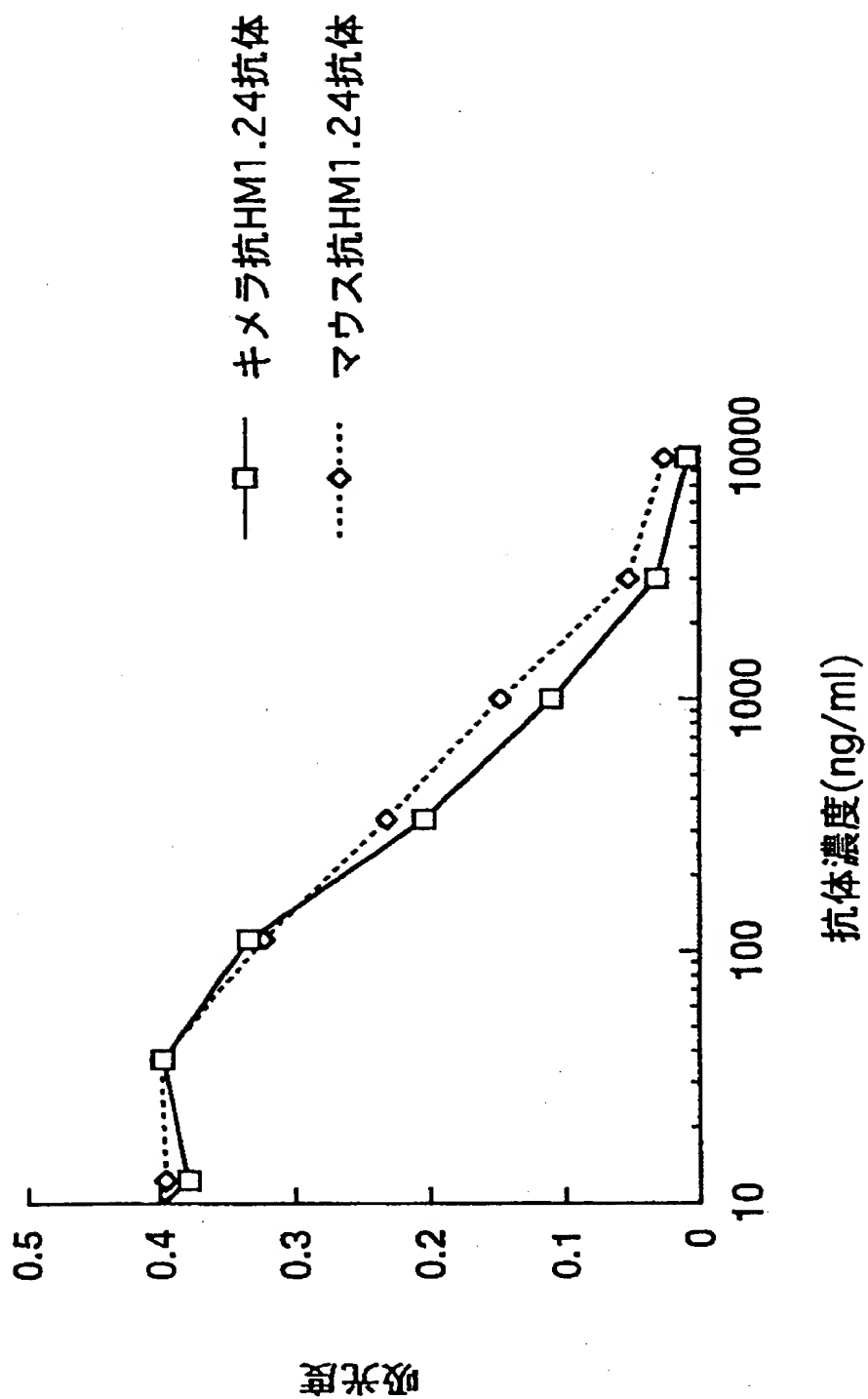
図32は、精製再構成ヒト抗HM1.24抗体は、キメラ抗HM1.24抗体と同程度の結合阻害活性を有することを示すグラフである。

【書類名】 図面

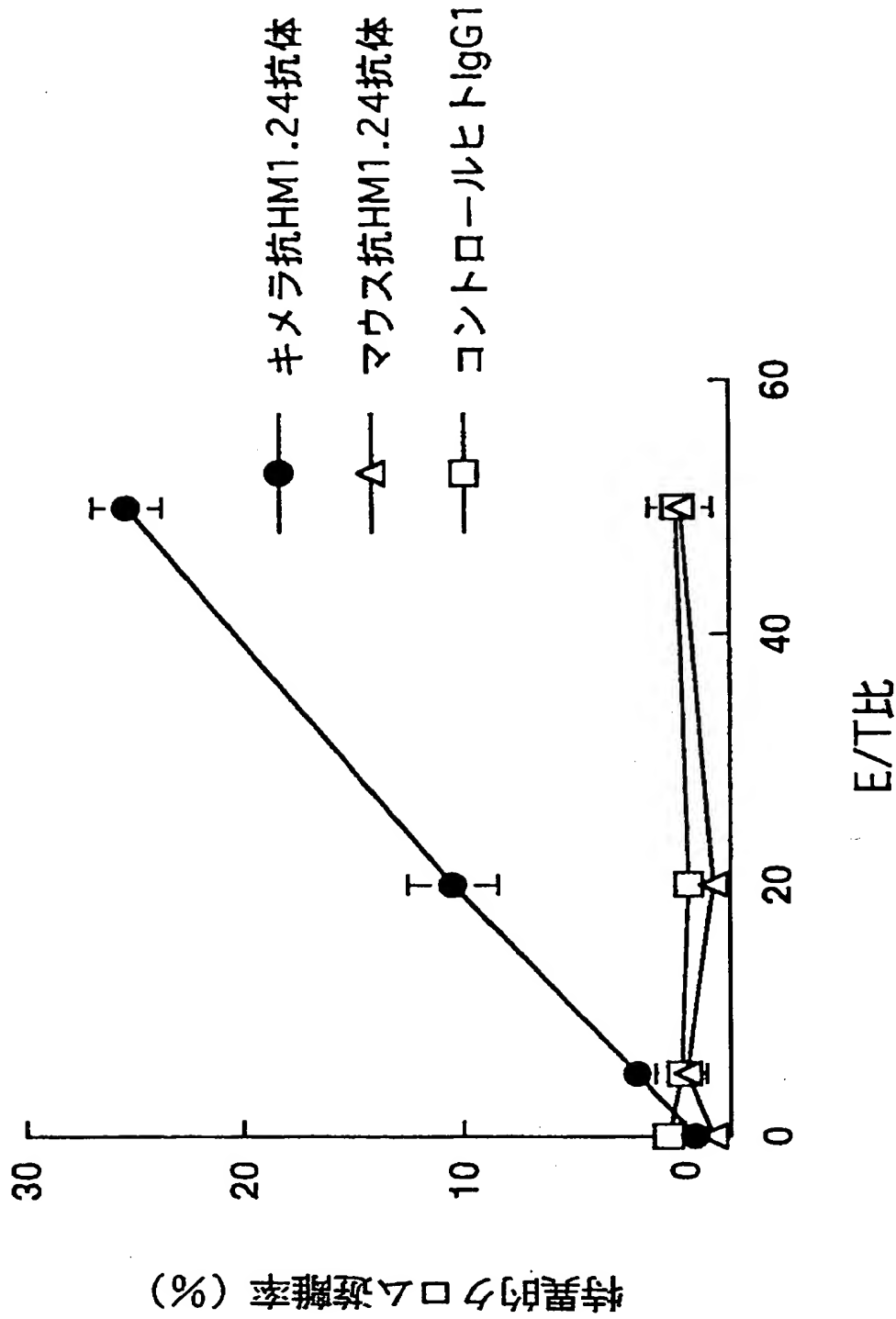
【図1】



【図2】

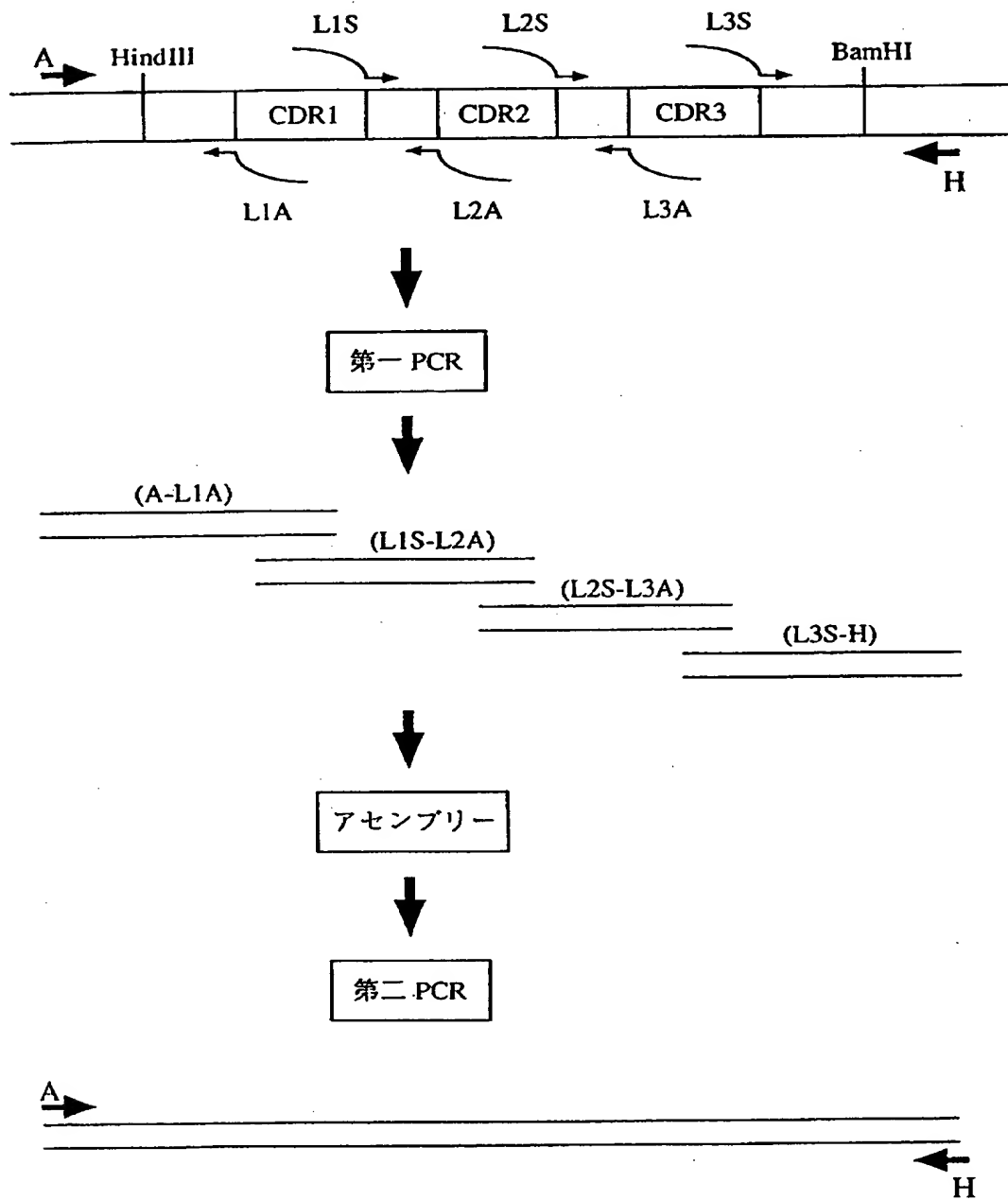


【図 3】

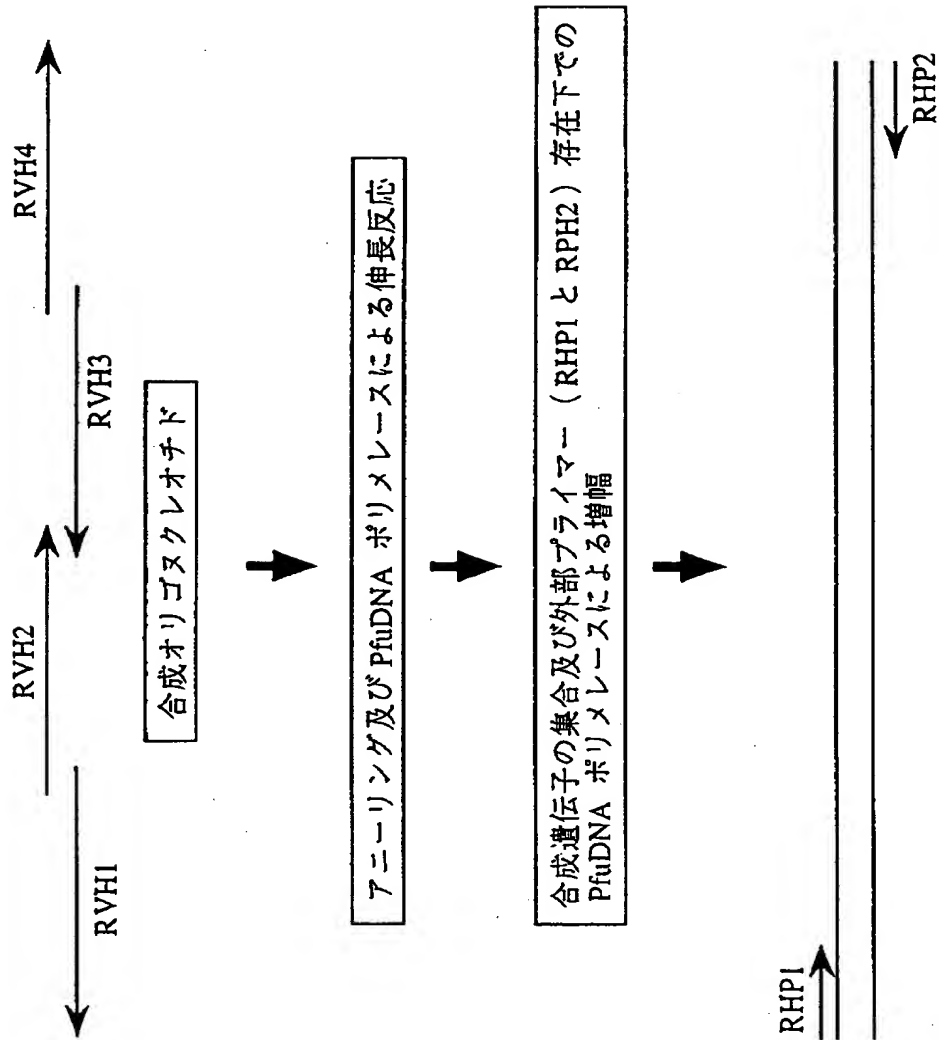




【図4】

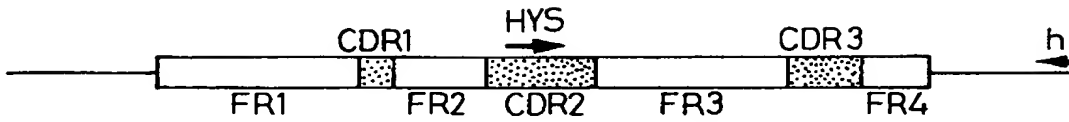


【図5】

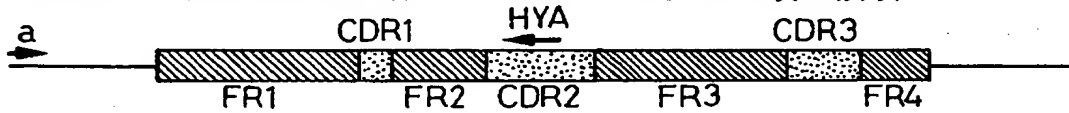


【図6】

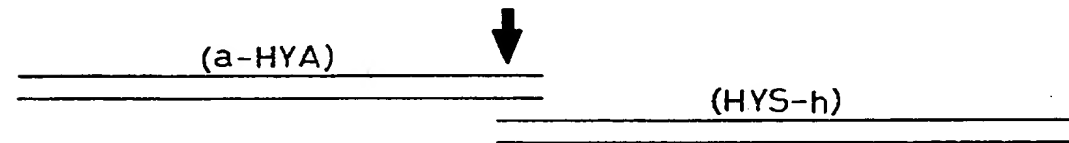
マウス抗HM1.24抗体V領域



再構成ヒト抗HM1.24抗体バージョン「a」のH鎖V領域

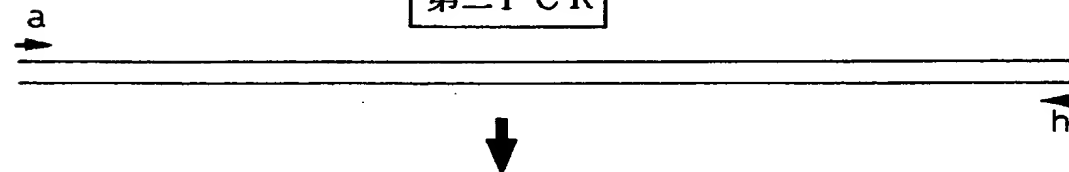


第一PCR



アセンブリー

第二PCR

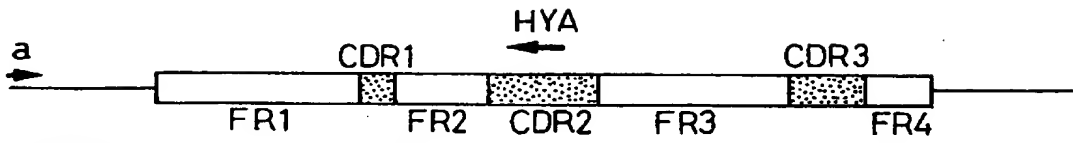


H鎖ヒト・マウスハイブリッドV領域

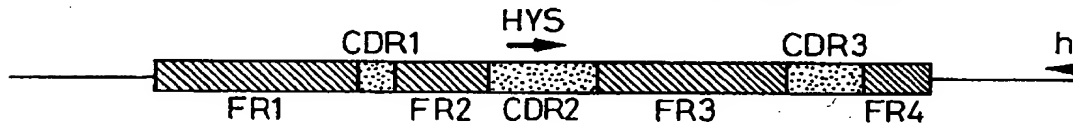


【図 7】

マウス抗HM1.24抗体V領域



再構成ヒト抗HM1.24抗体バージョン「a」のH鎖V領域



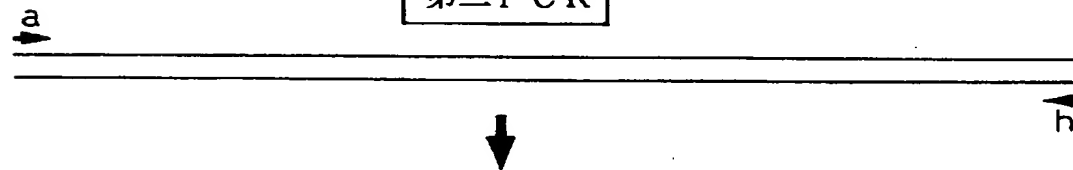
第一PCR

(a-HYA)

(HYS-h)

アセンブリー

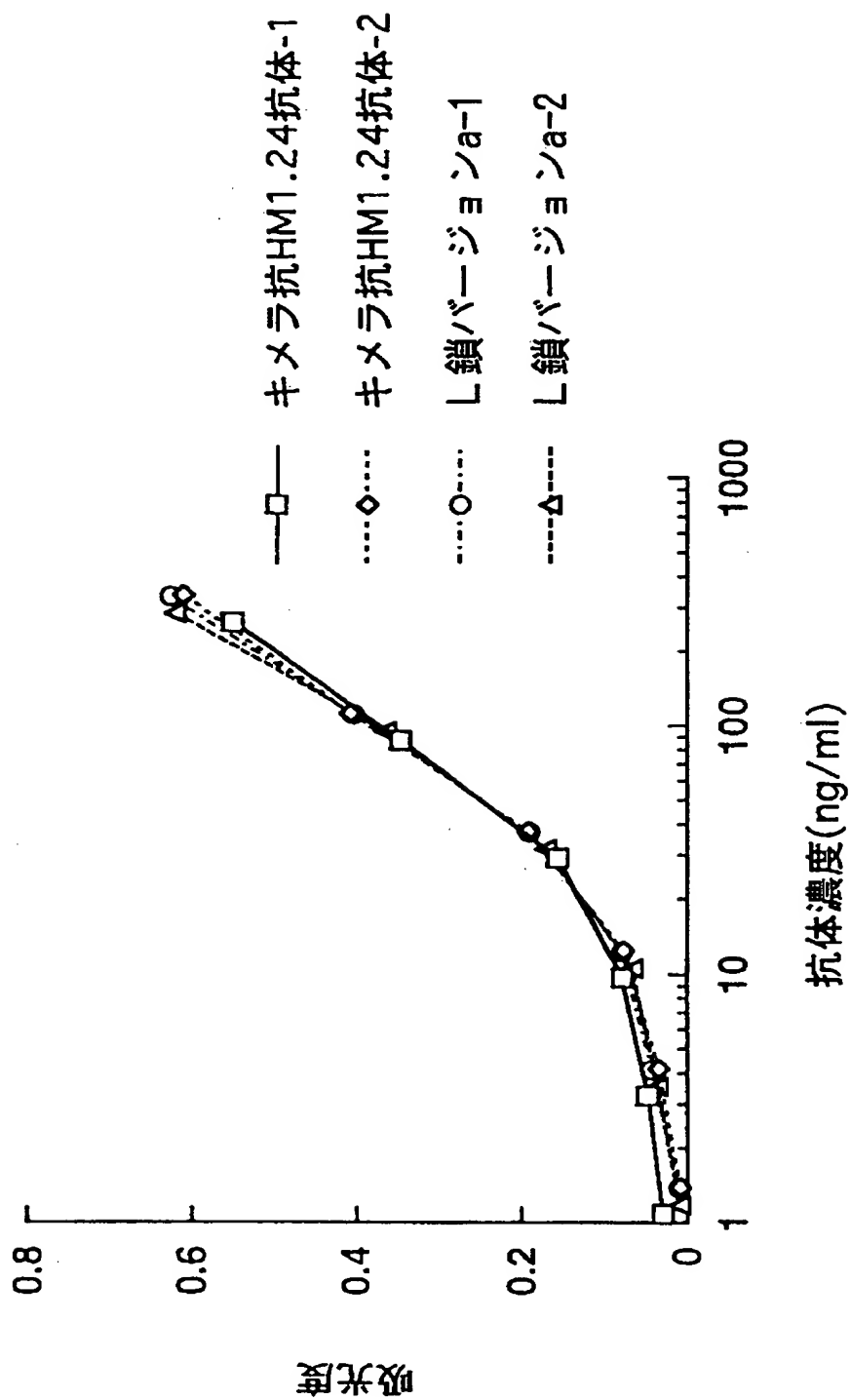
第二PCR



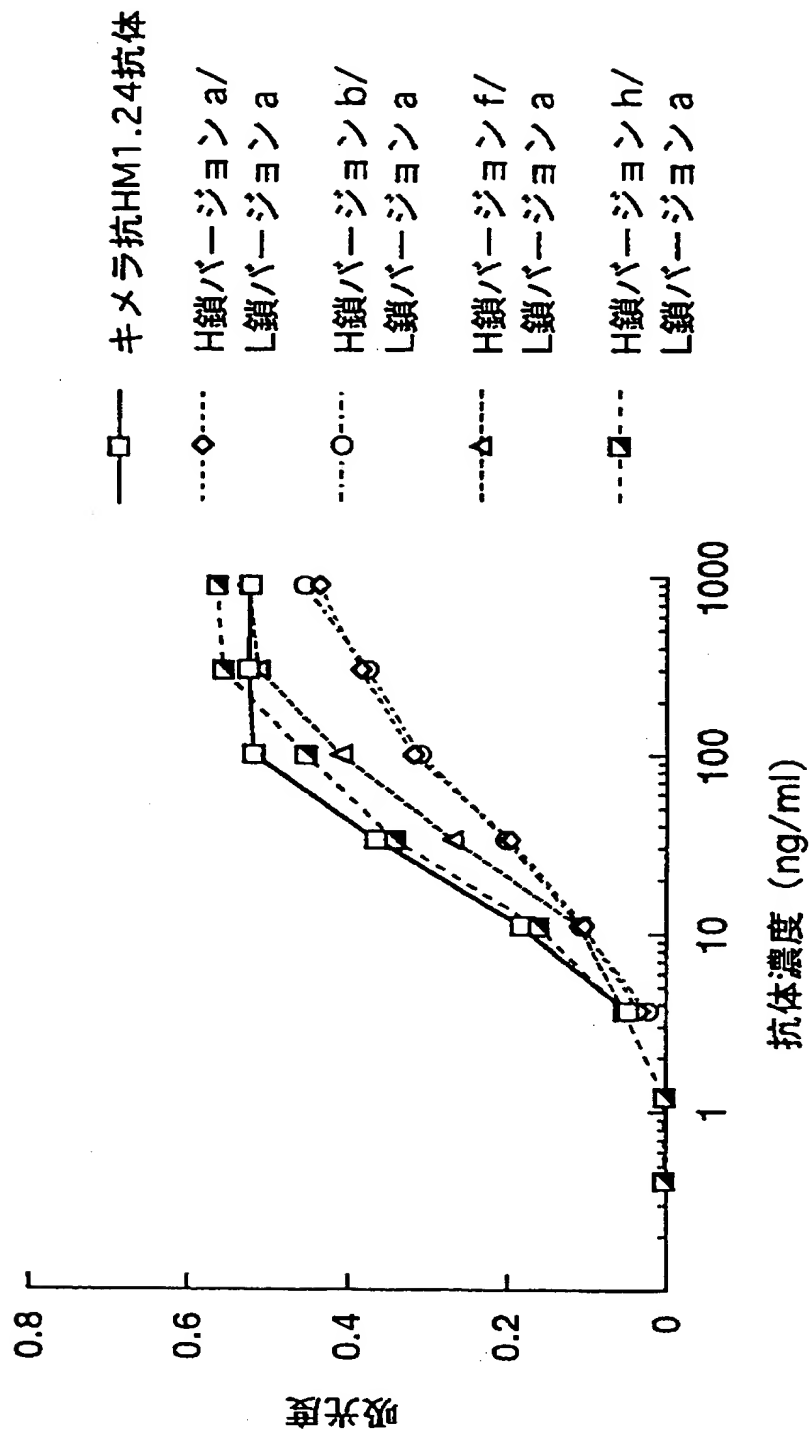
H鎖 マウス・ヒトハイブリッドV領域



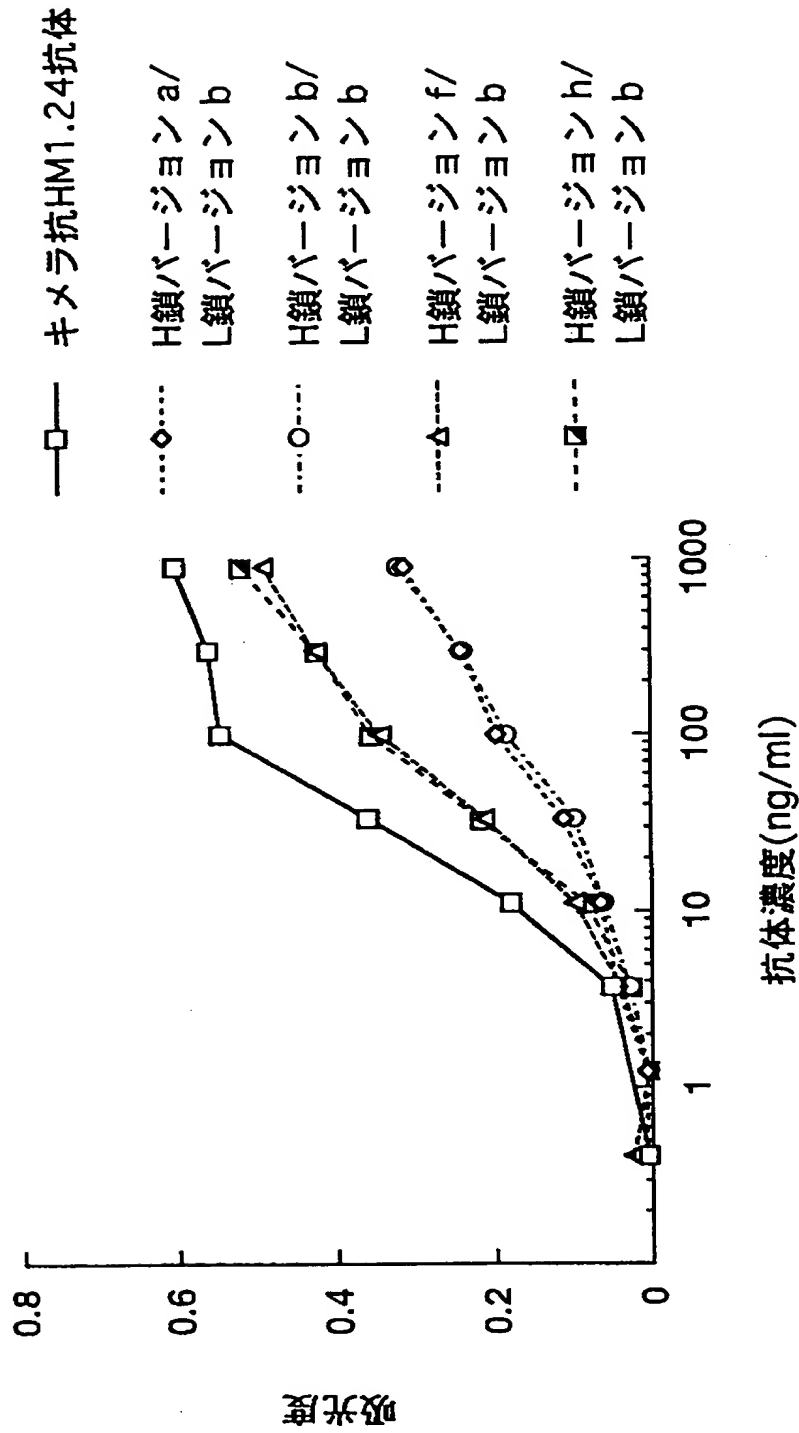
【図 8】



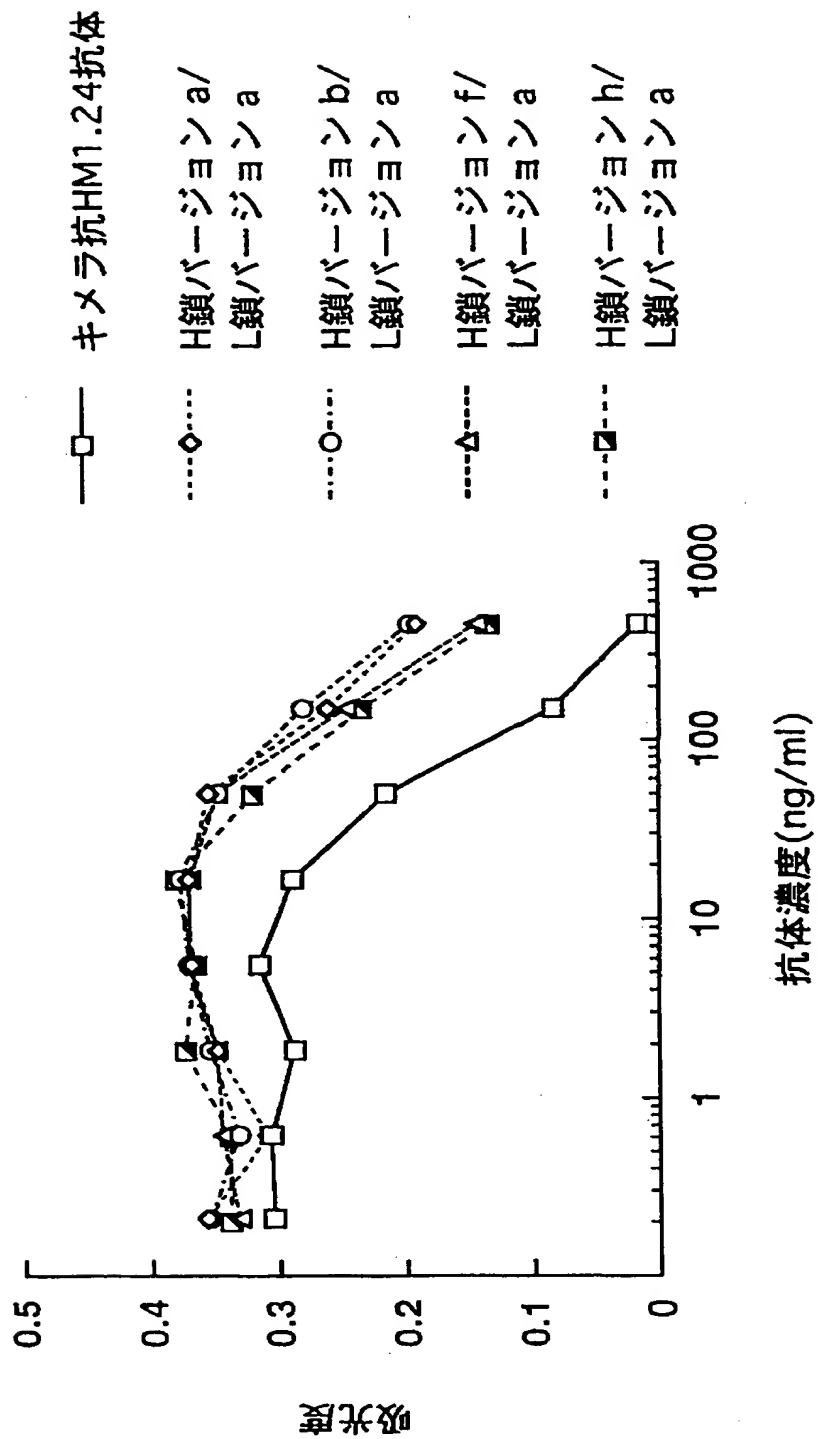
【図9】



【図10】

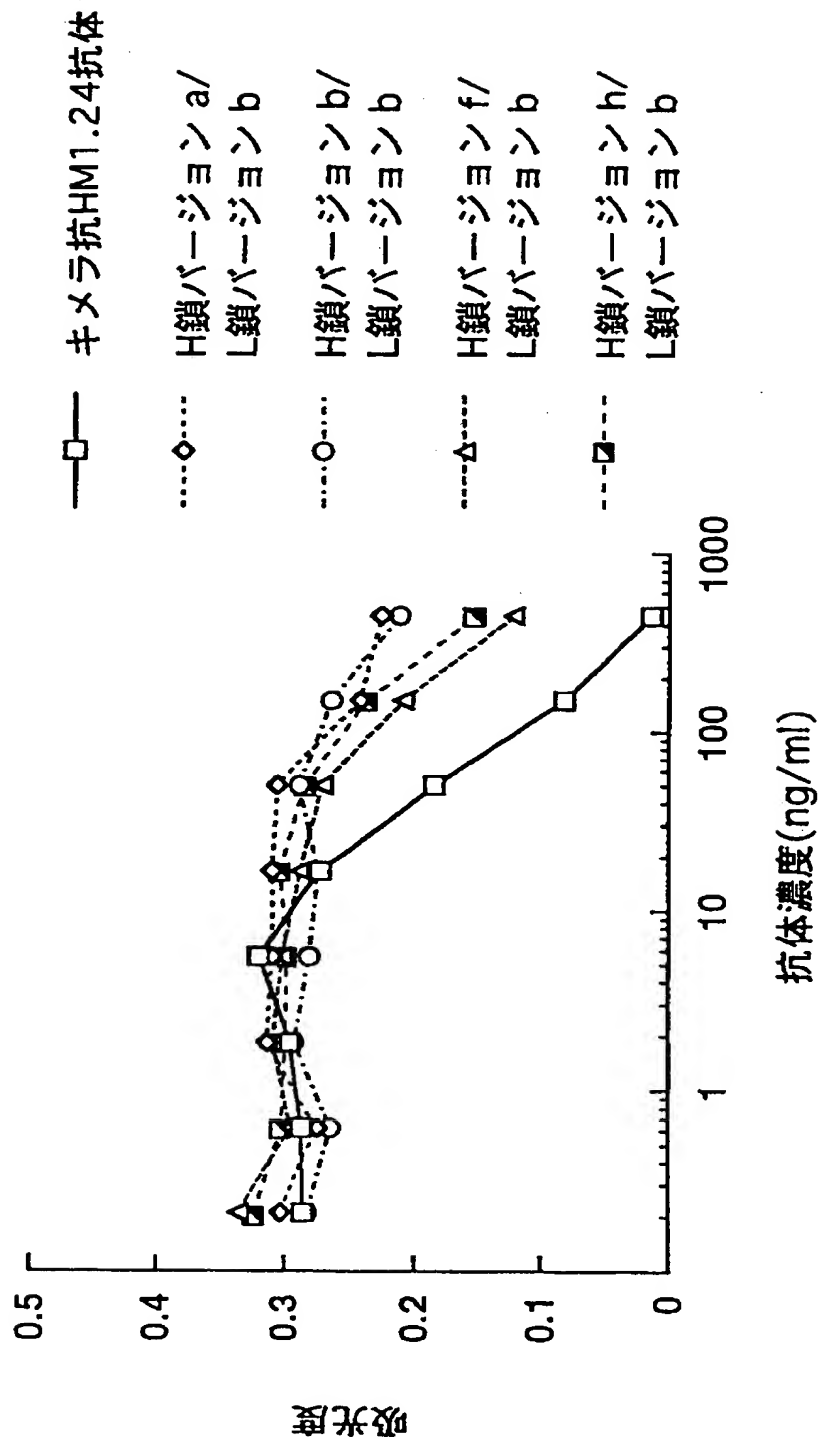


【図 1 1】

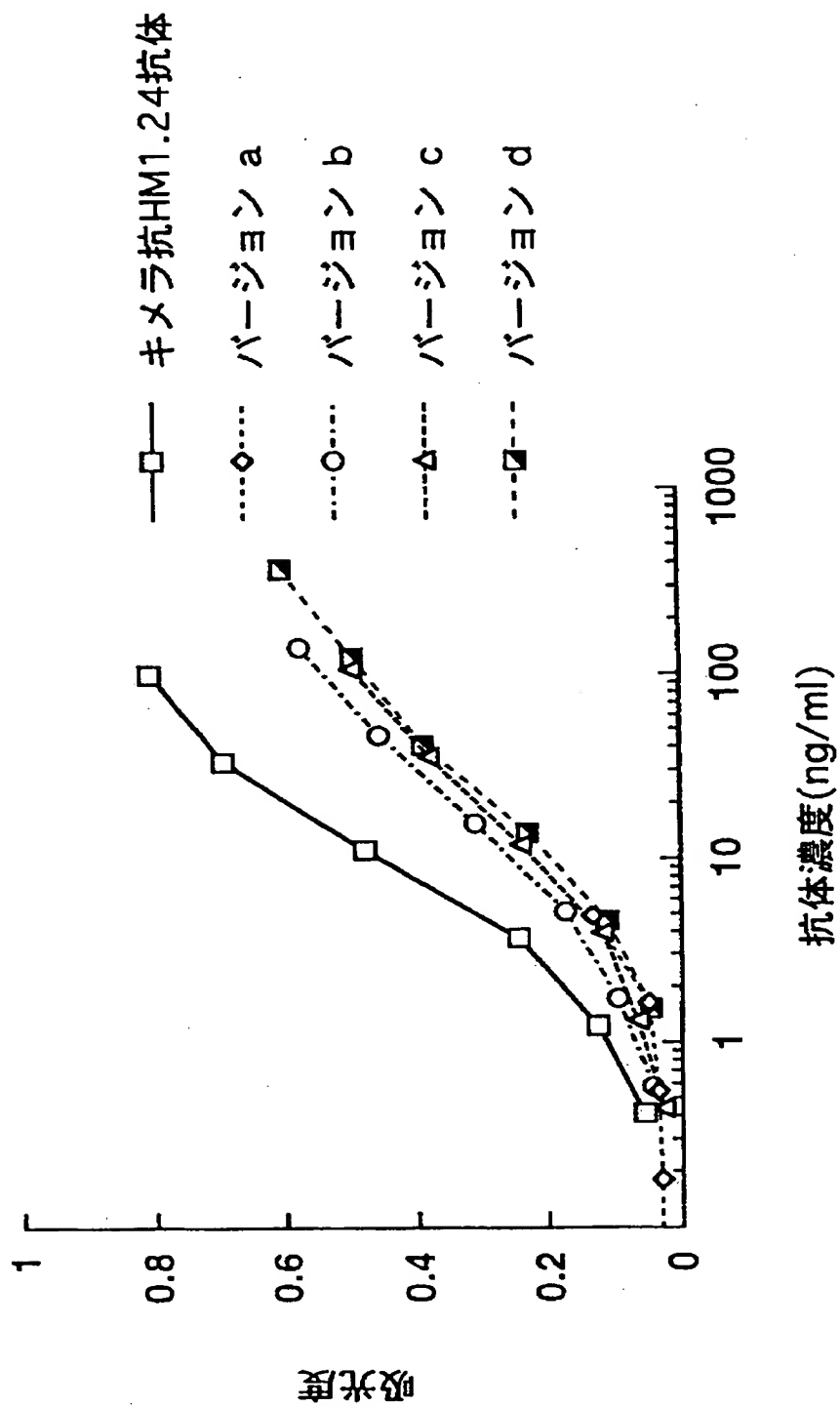




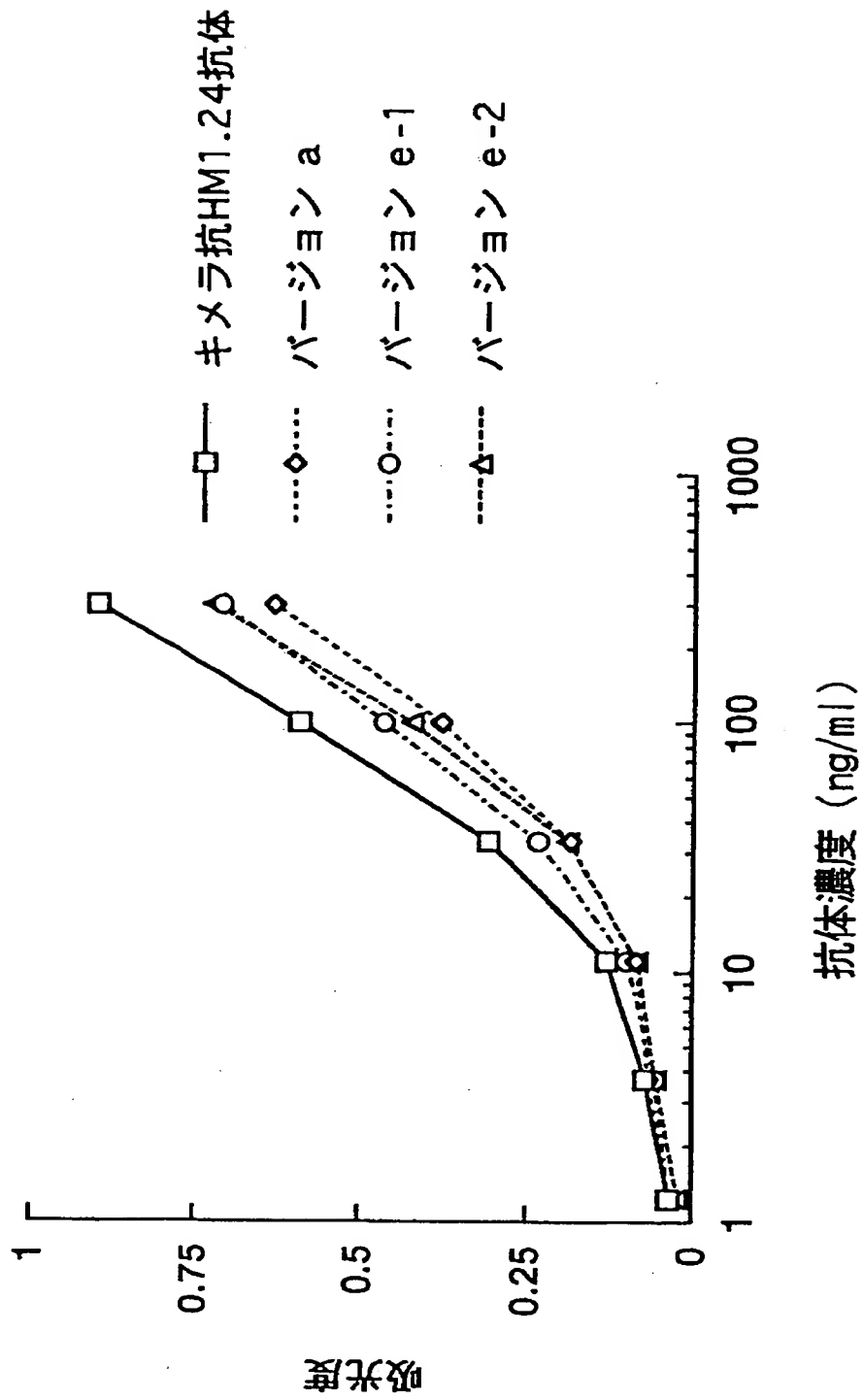
【図12】



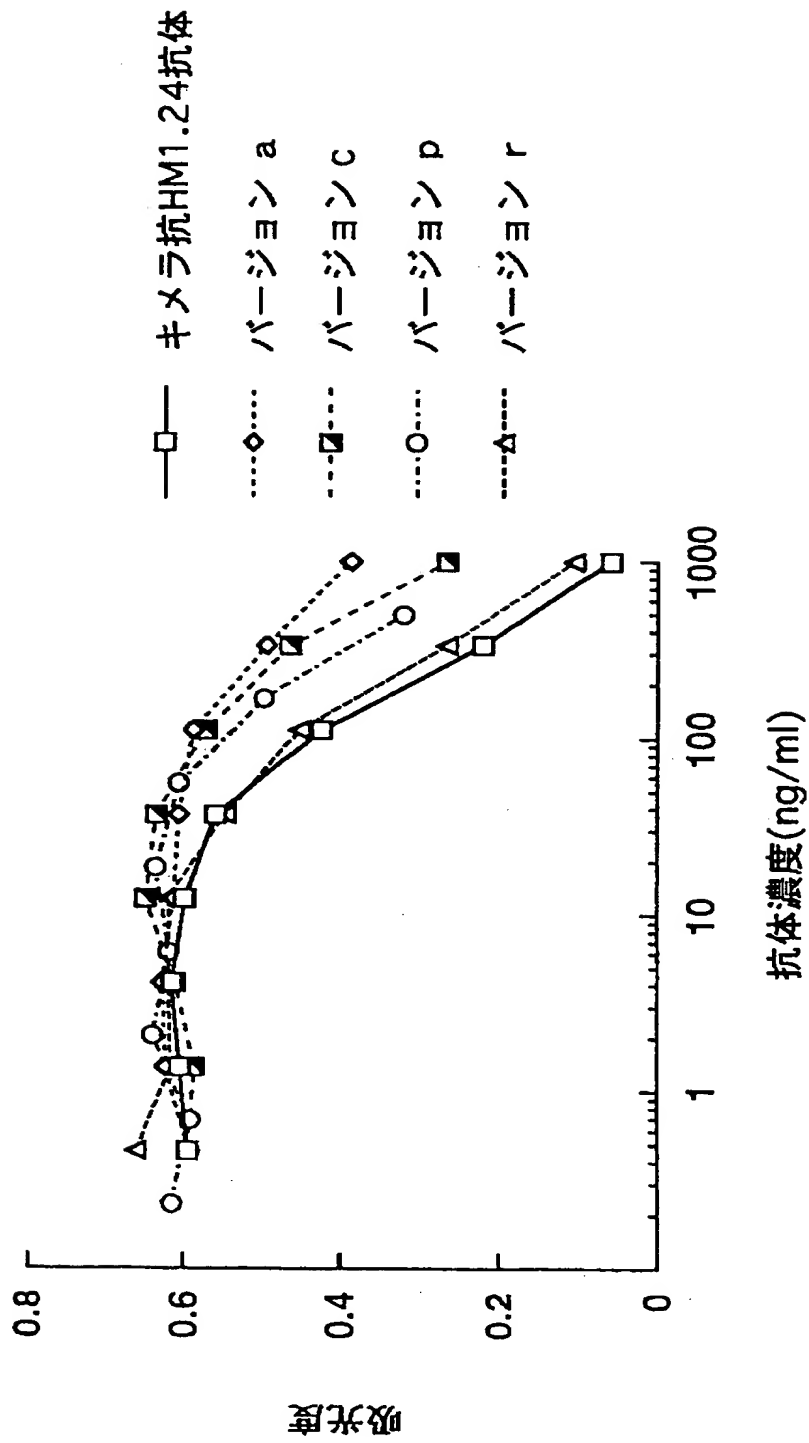
【図13】



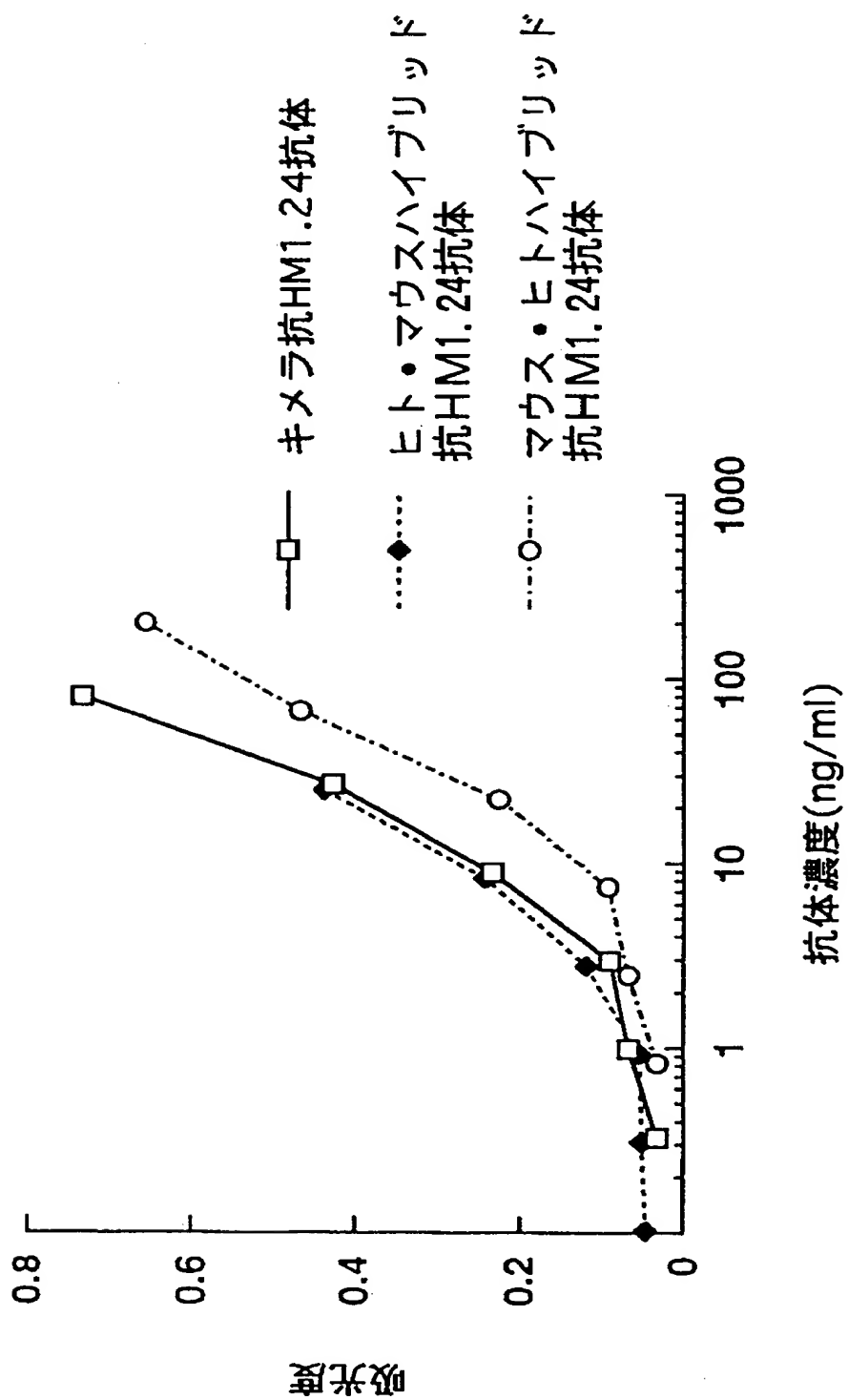
【図14】



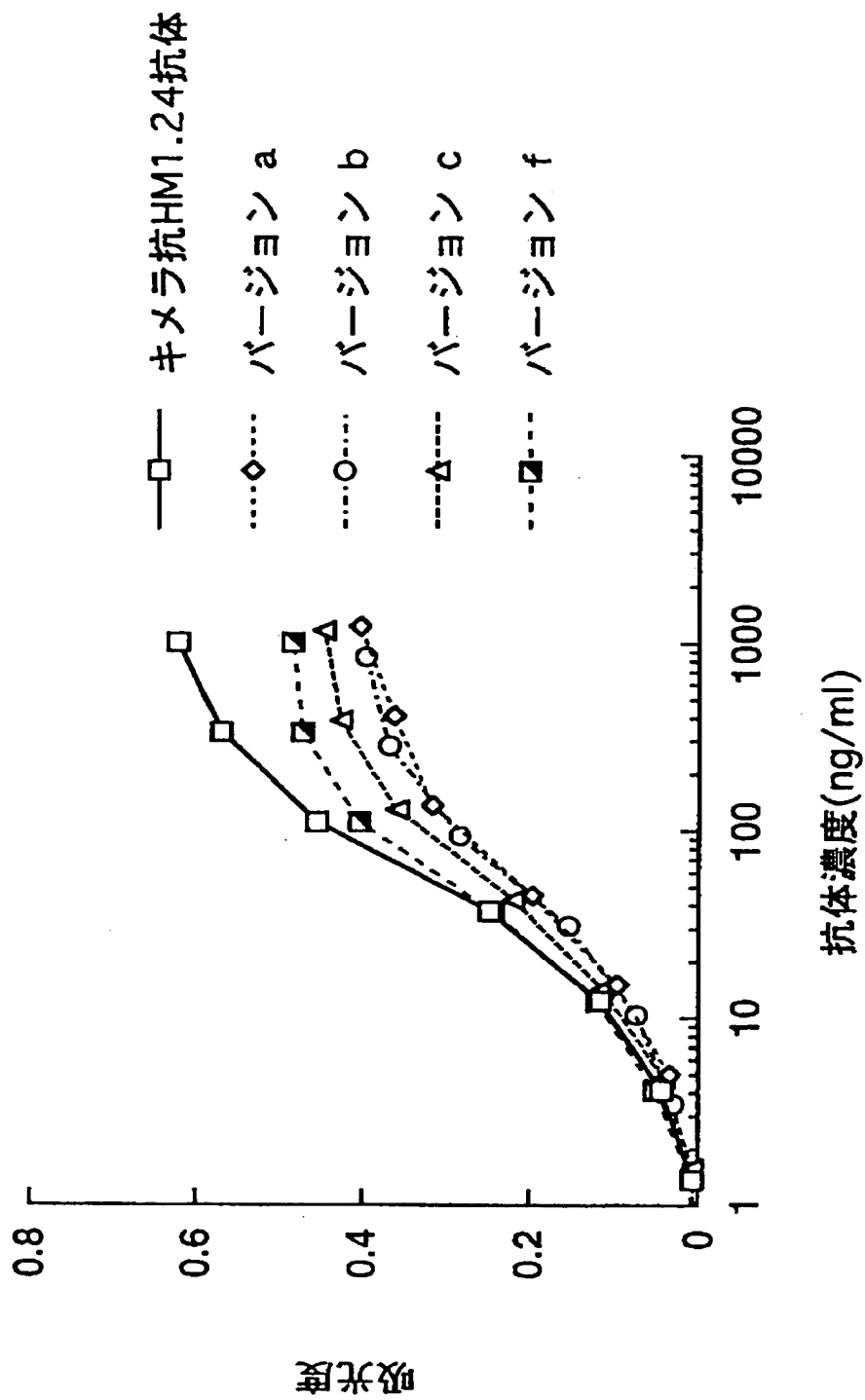
【図15】



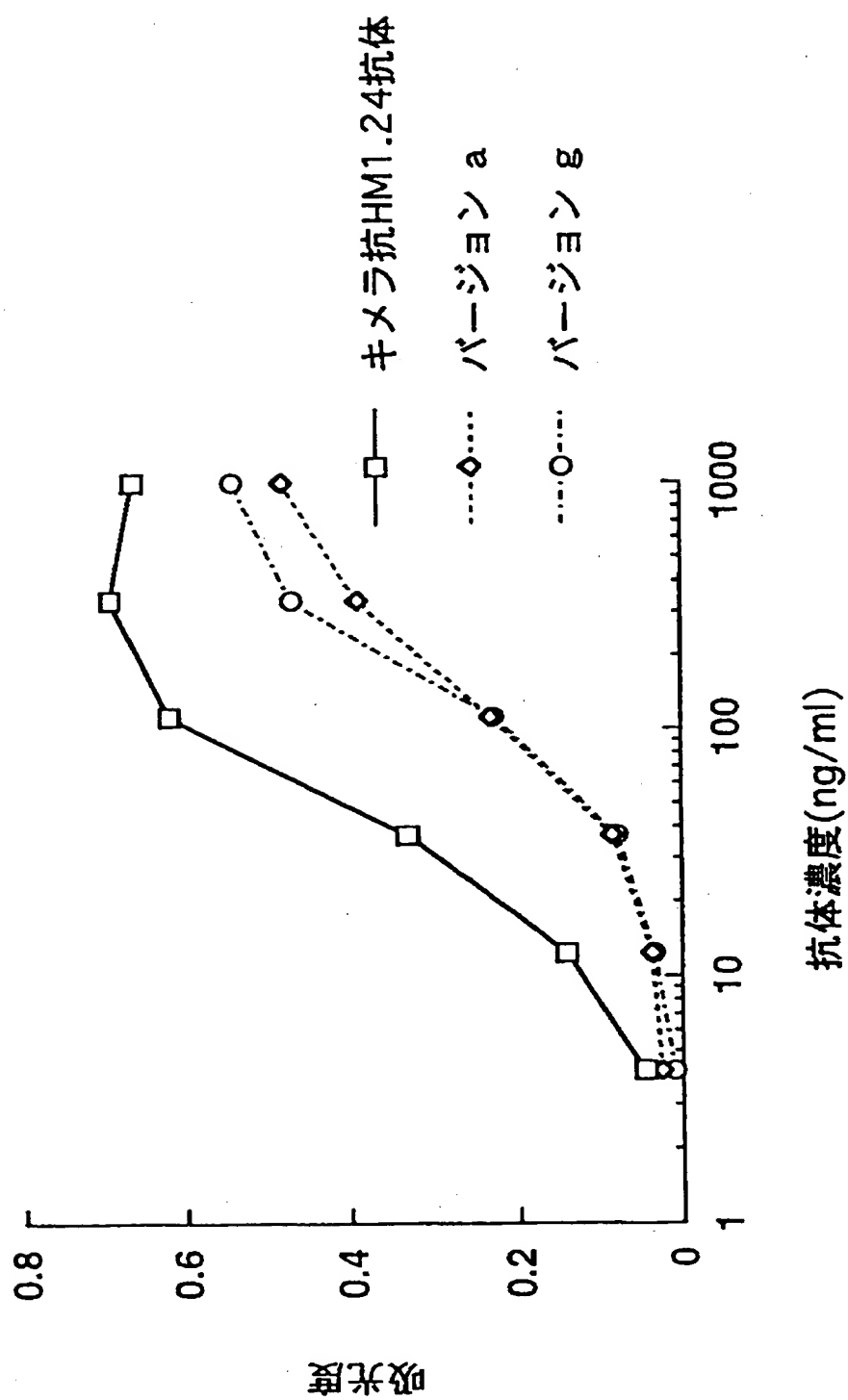
【図16】



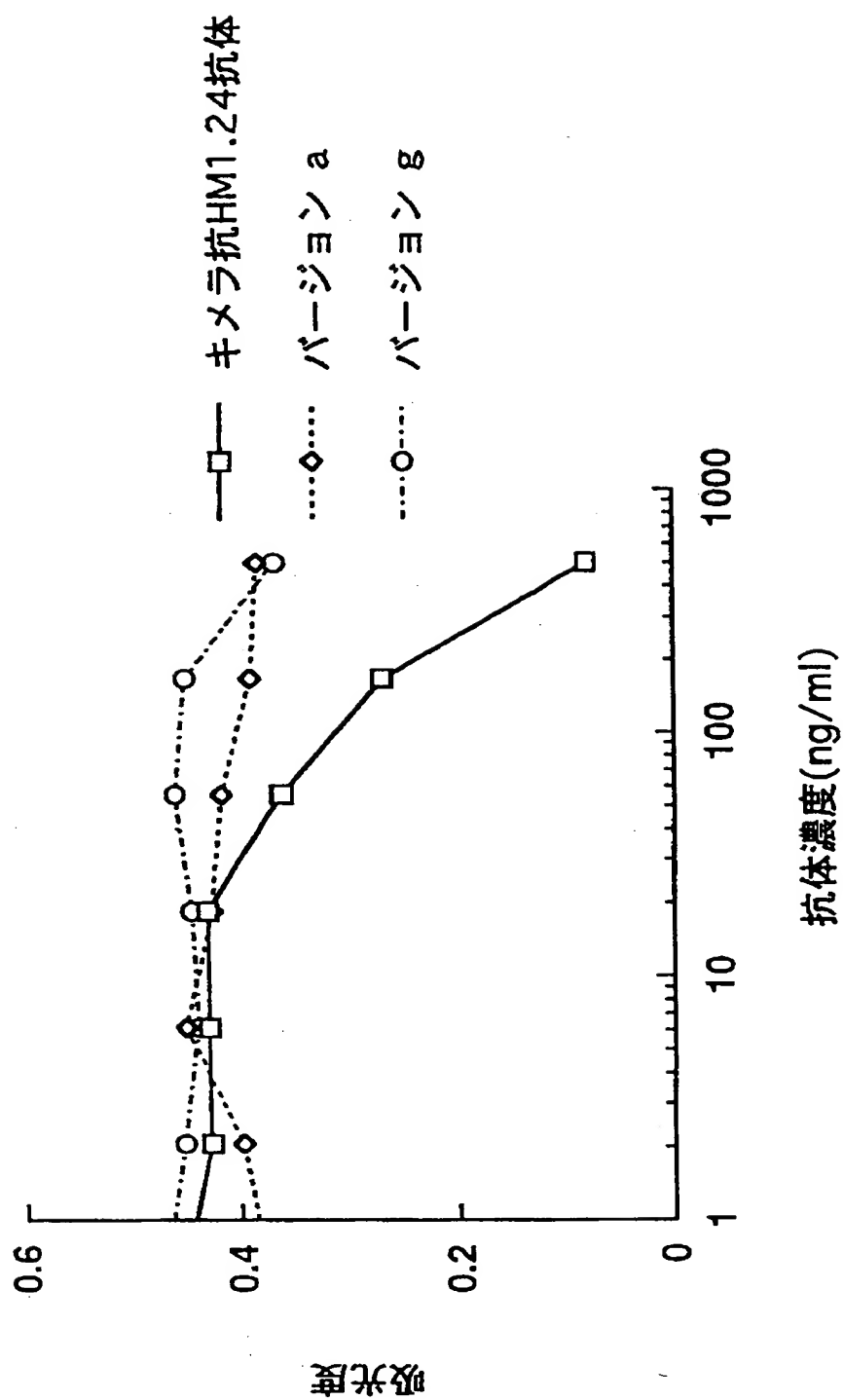
【図17】



【図18】

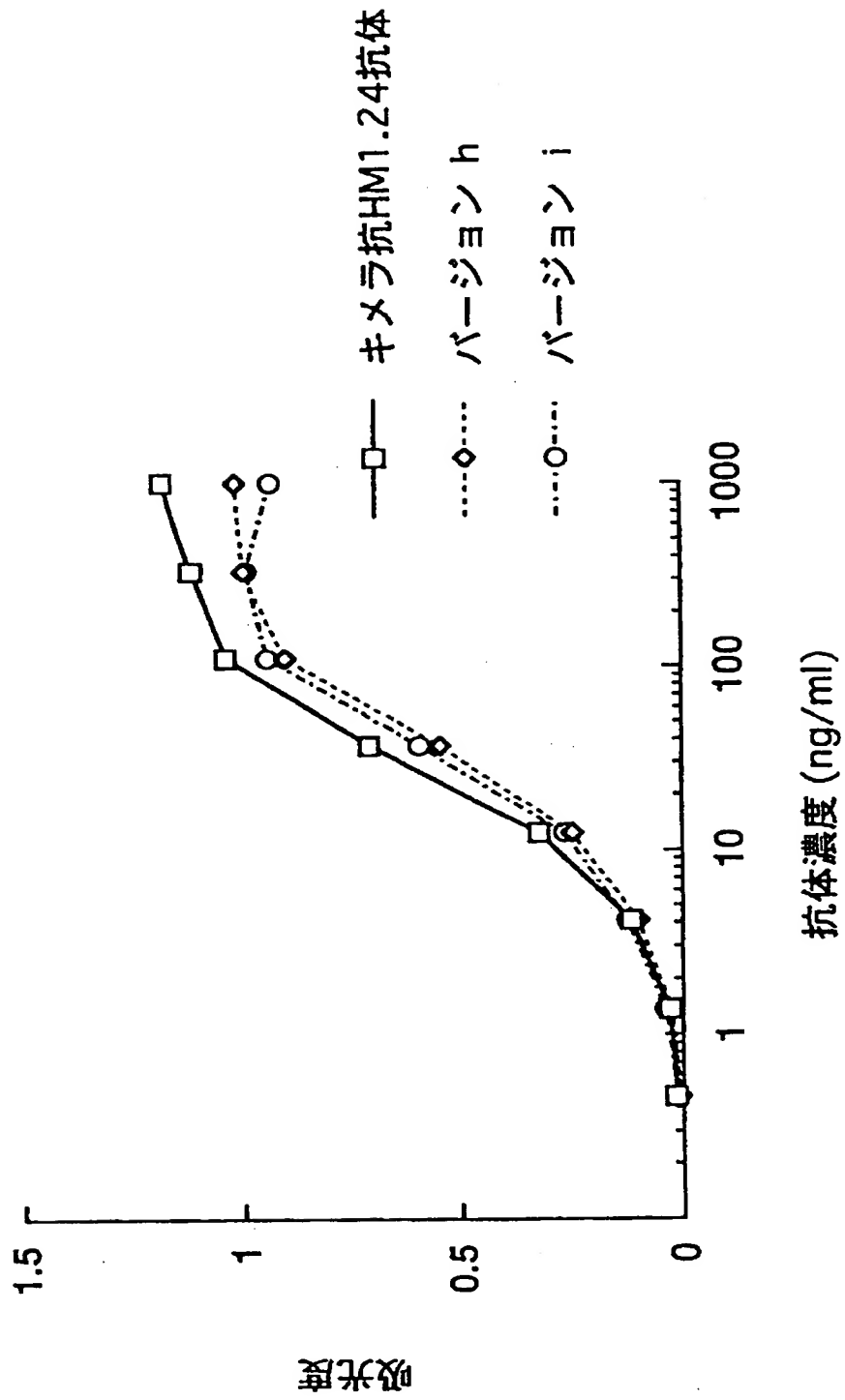


【図19】

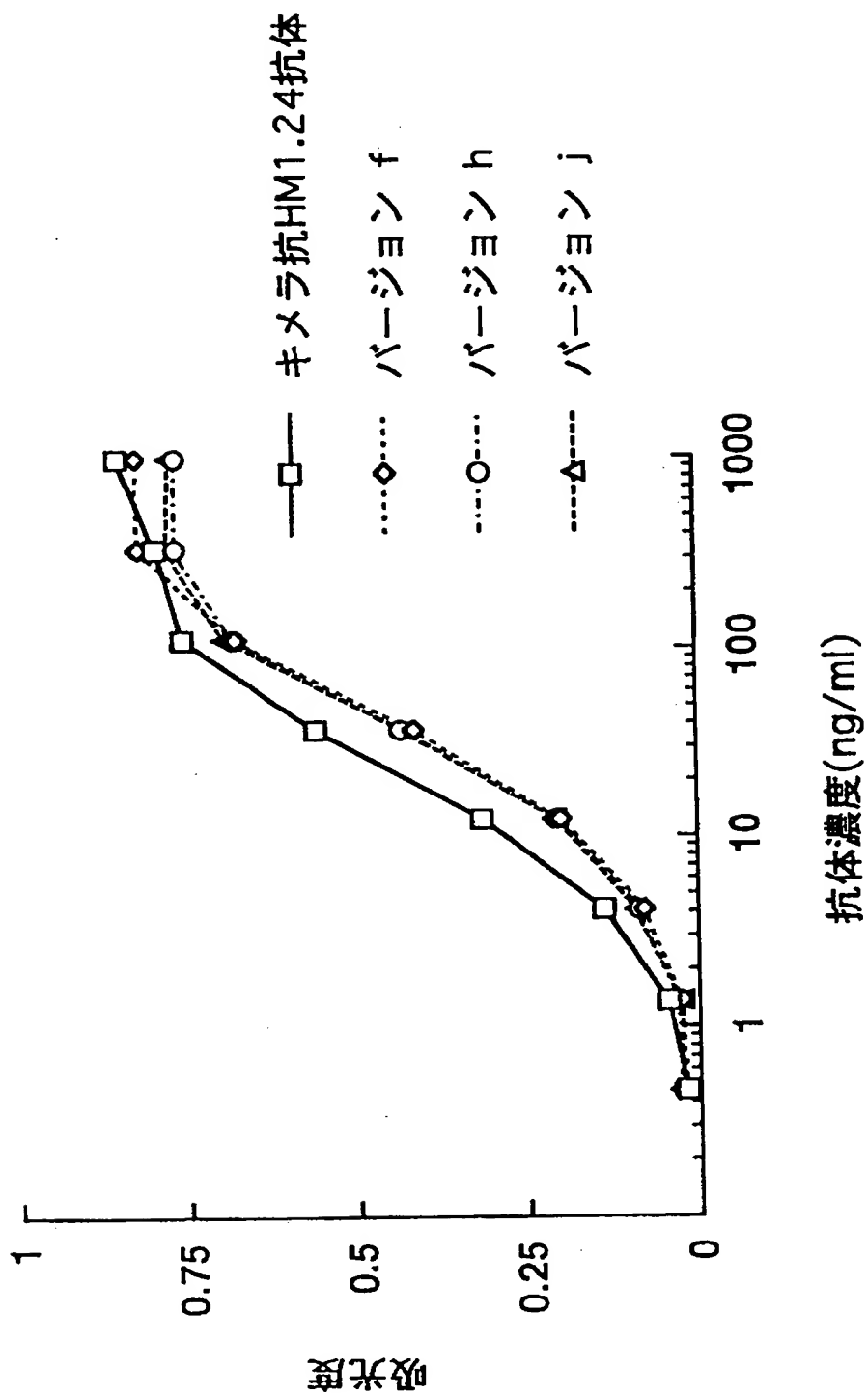




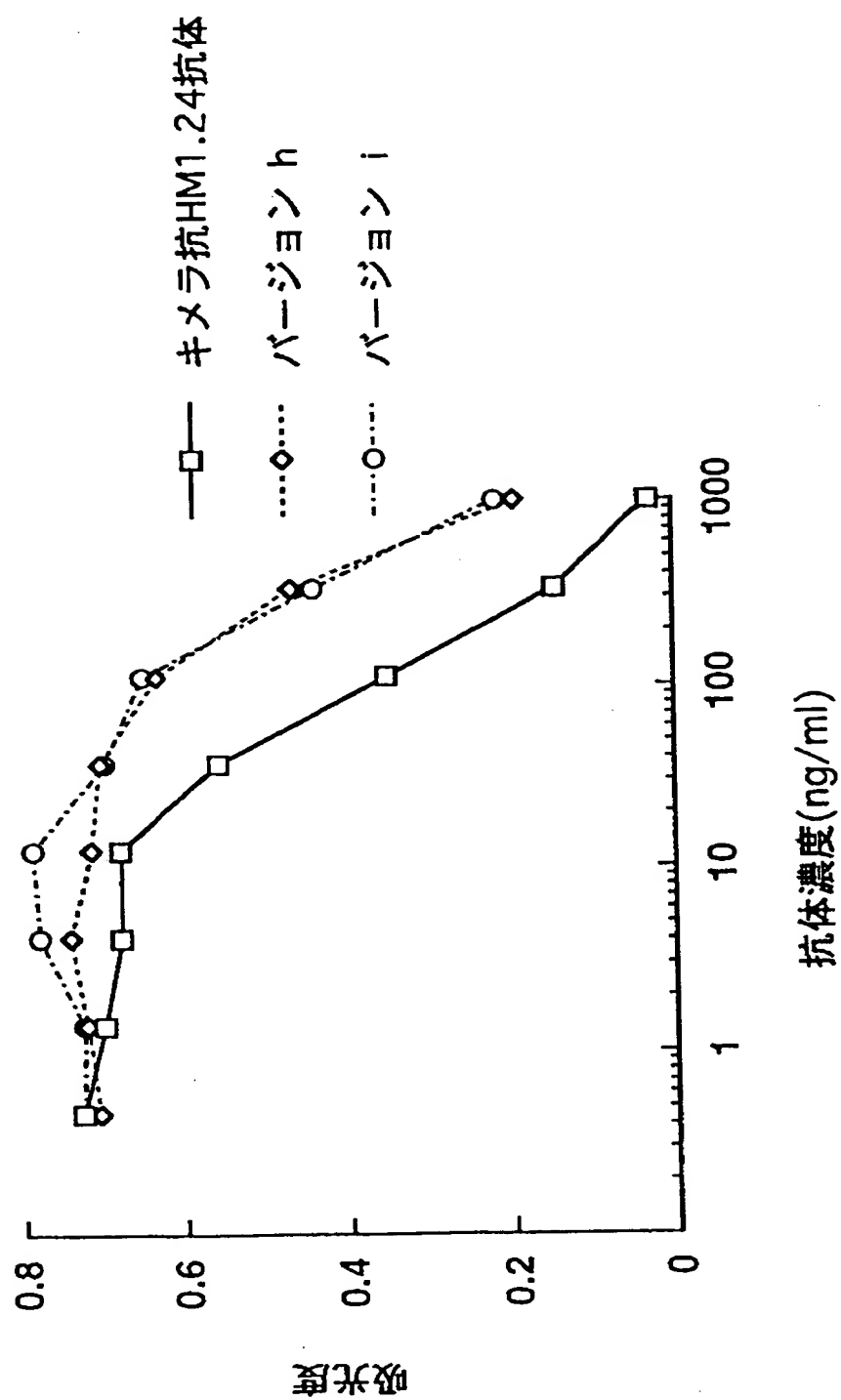
【図20】



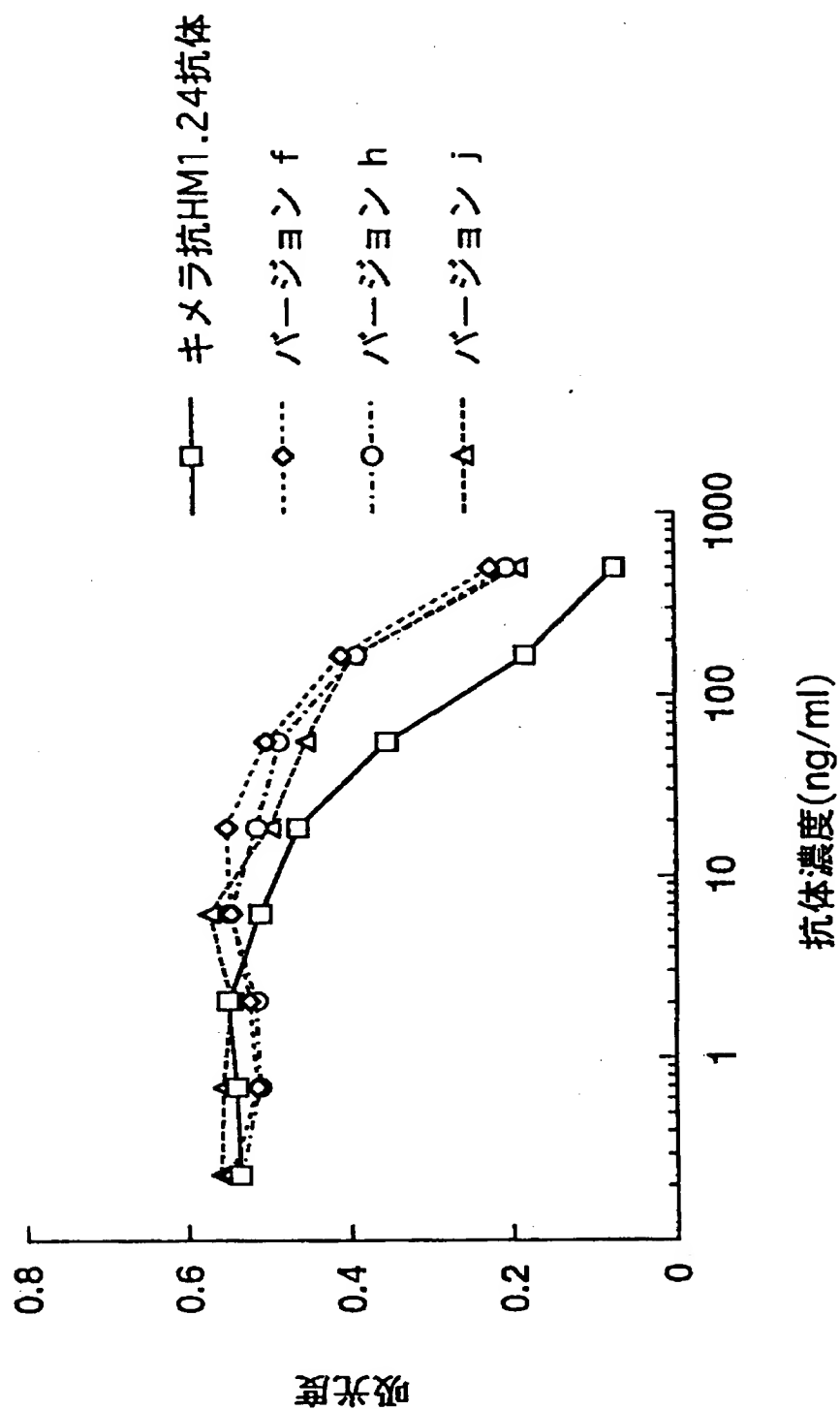
【図21】



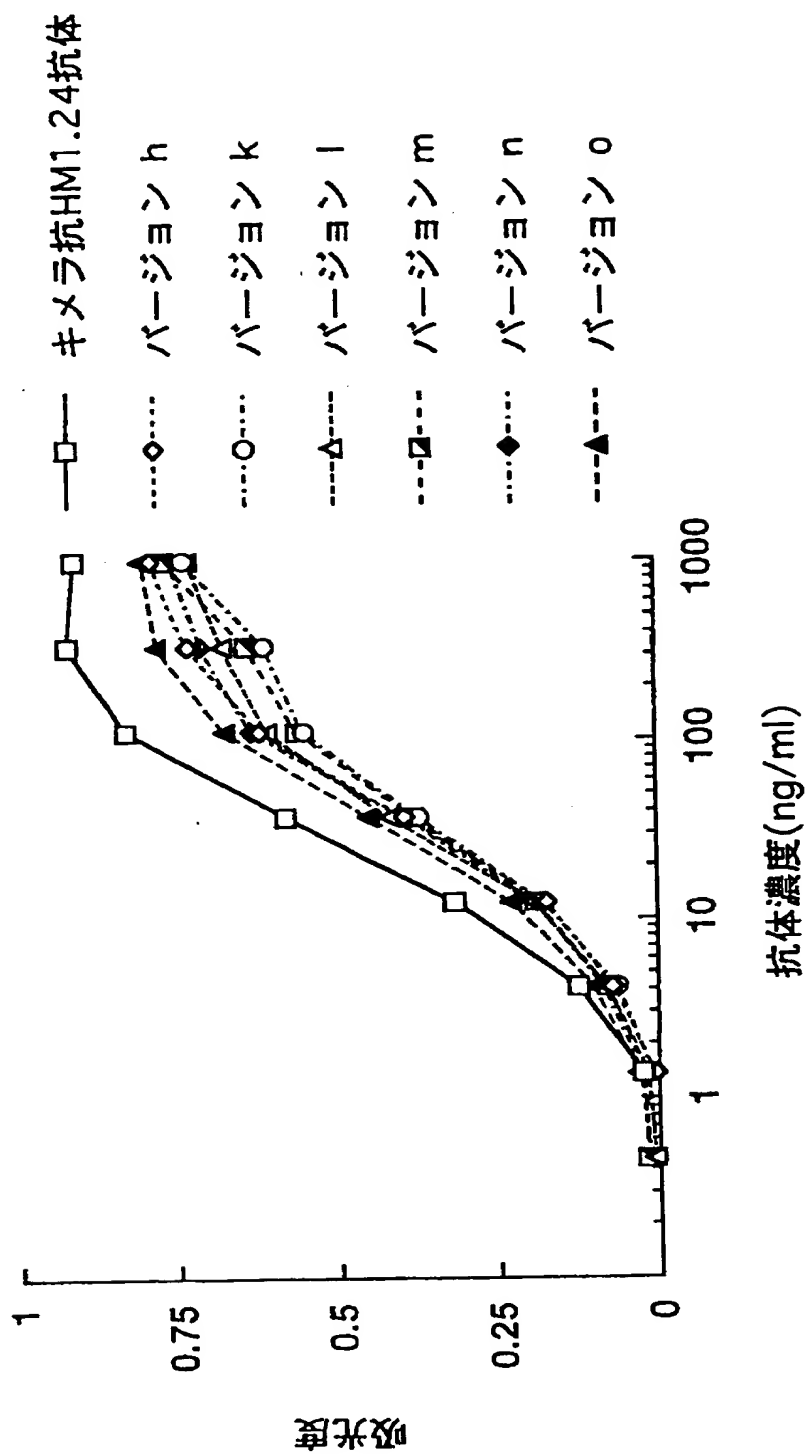
【図22】



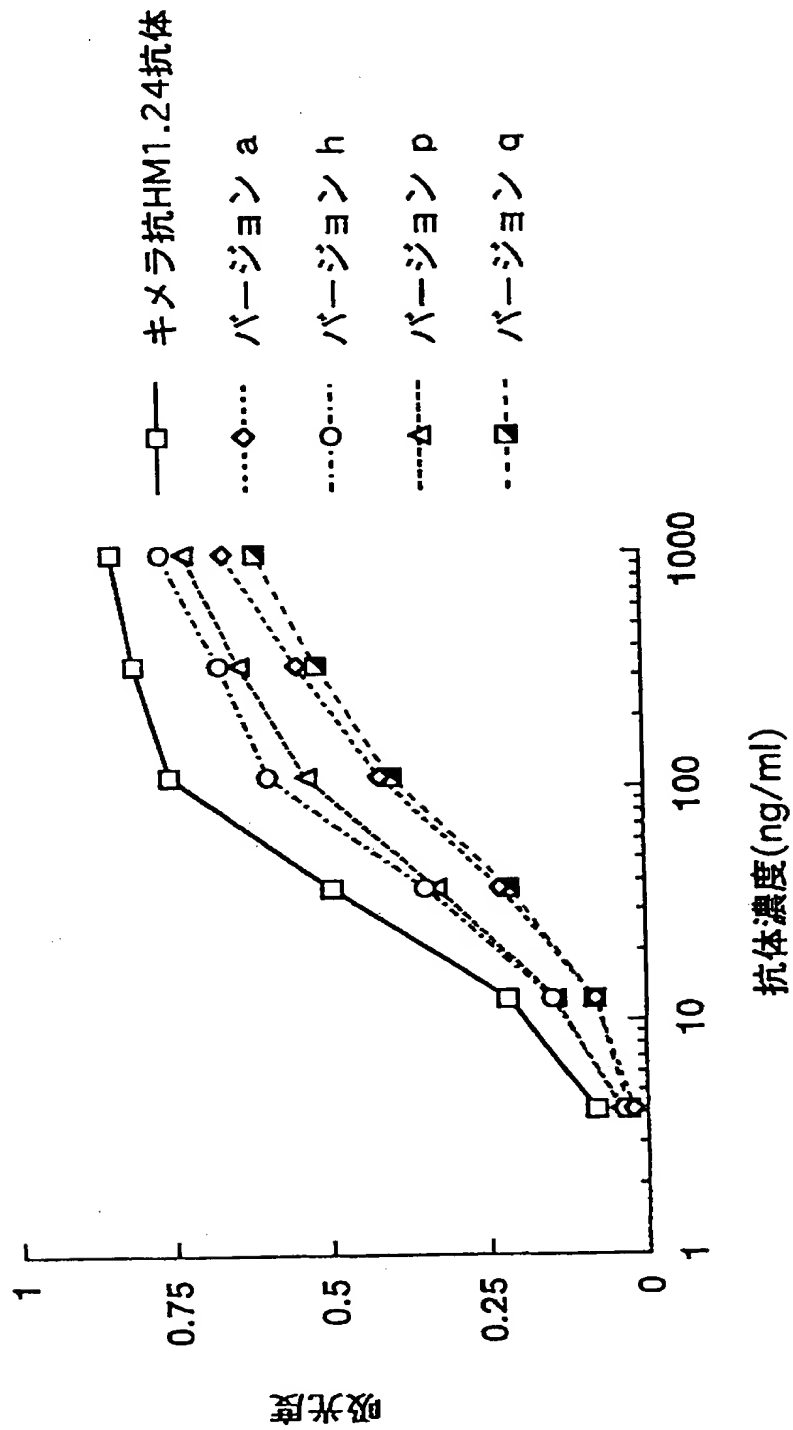
【図23】



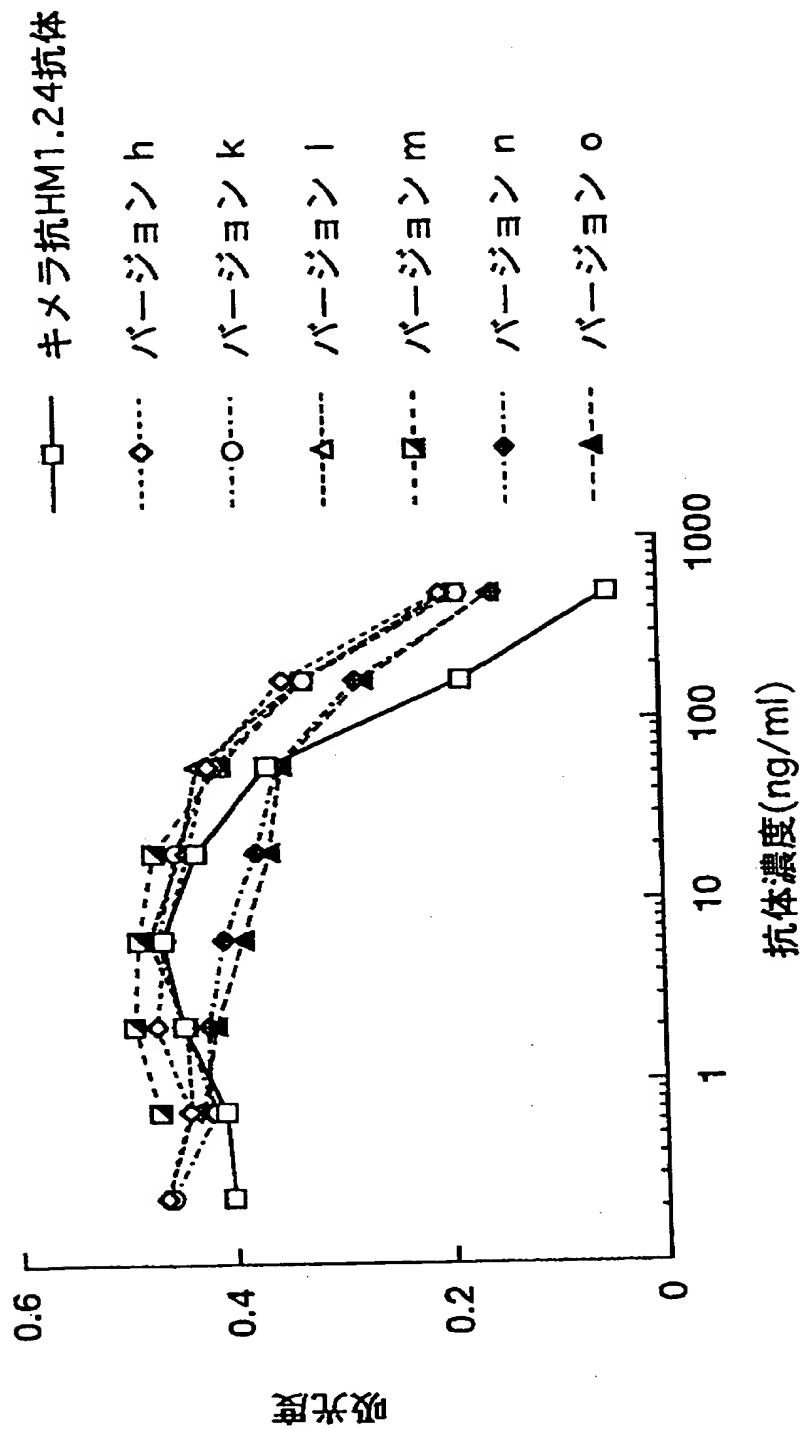
【図24】



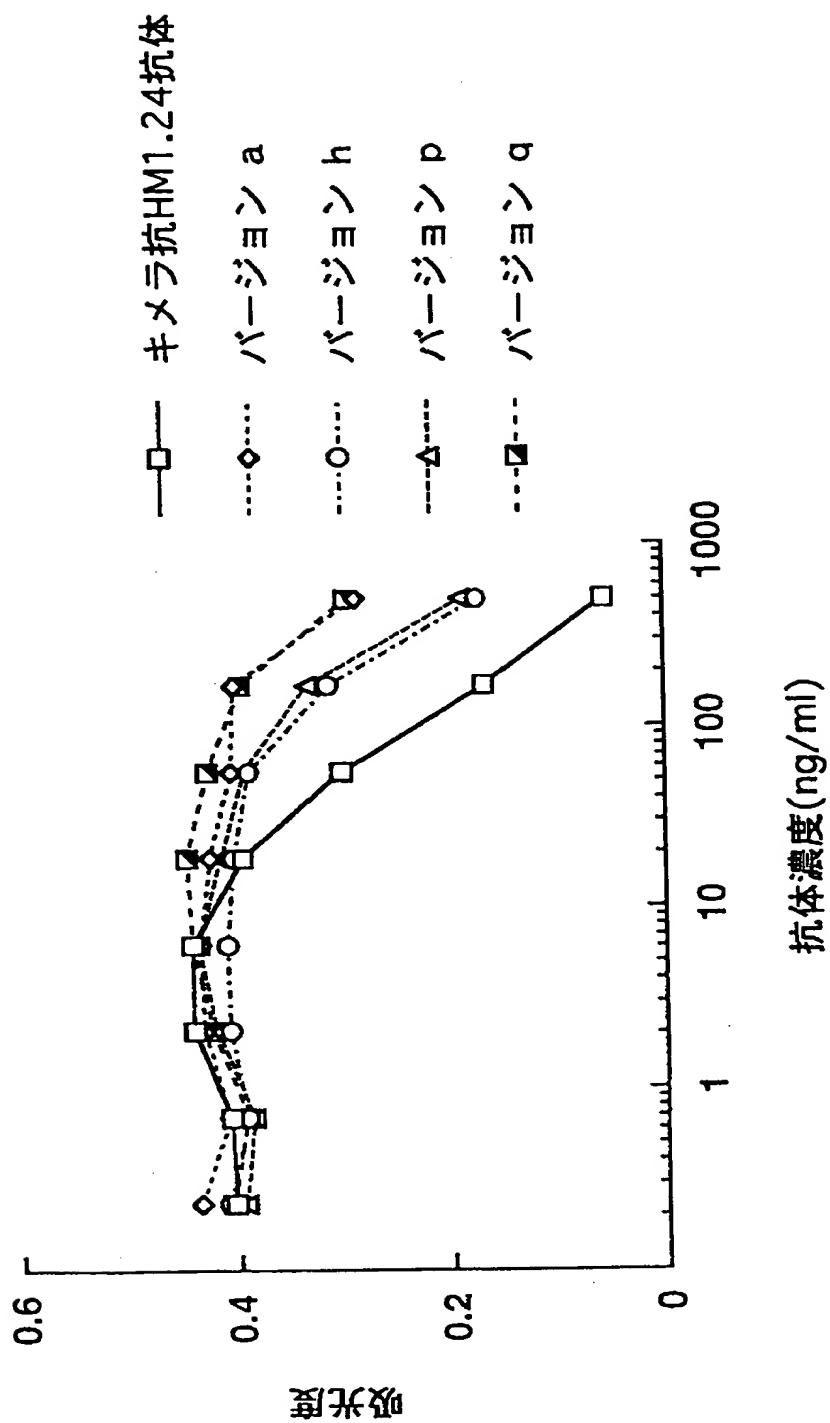
【図25】



【図26】

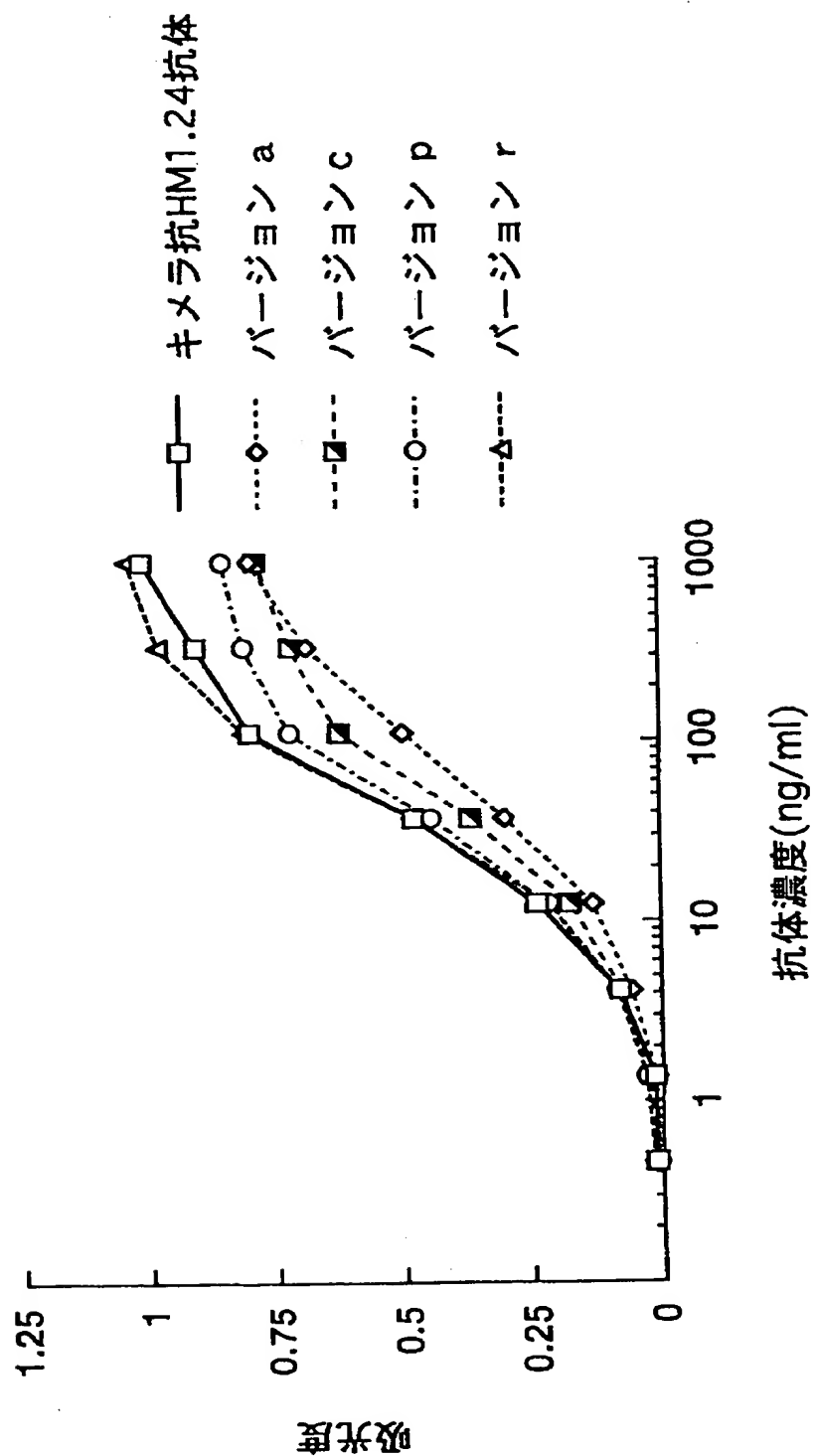


【図 27】

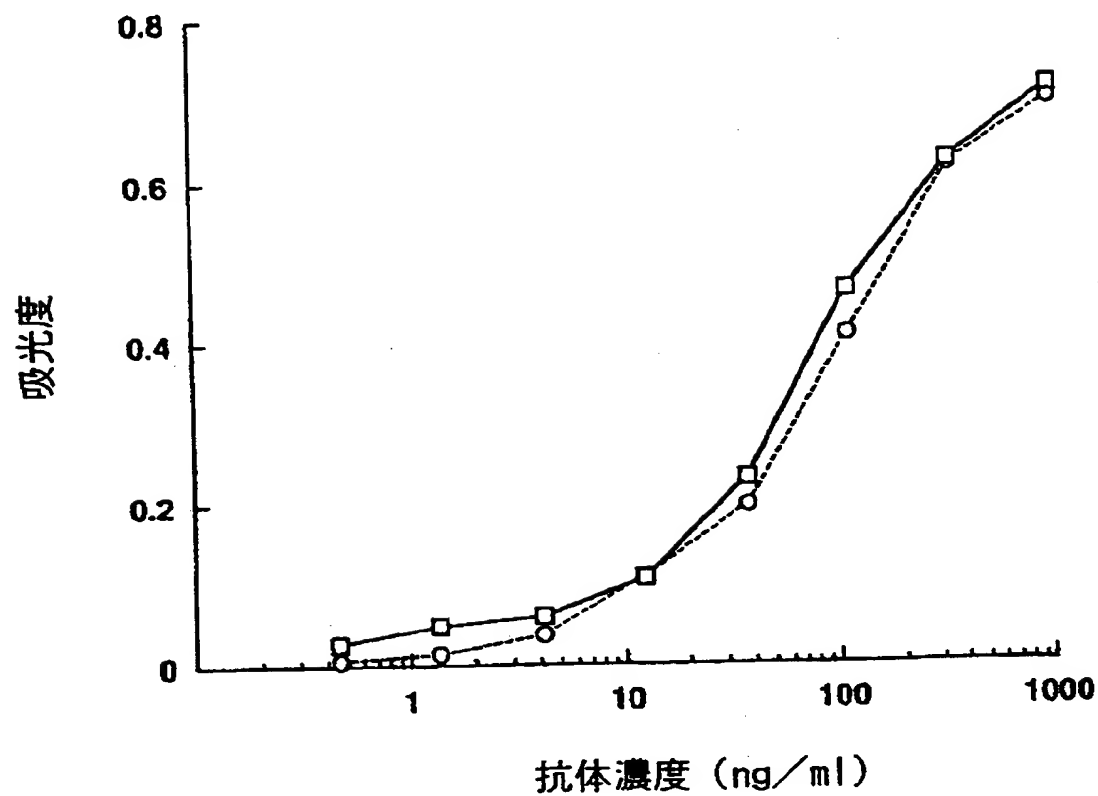




【図28】

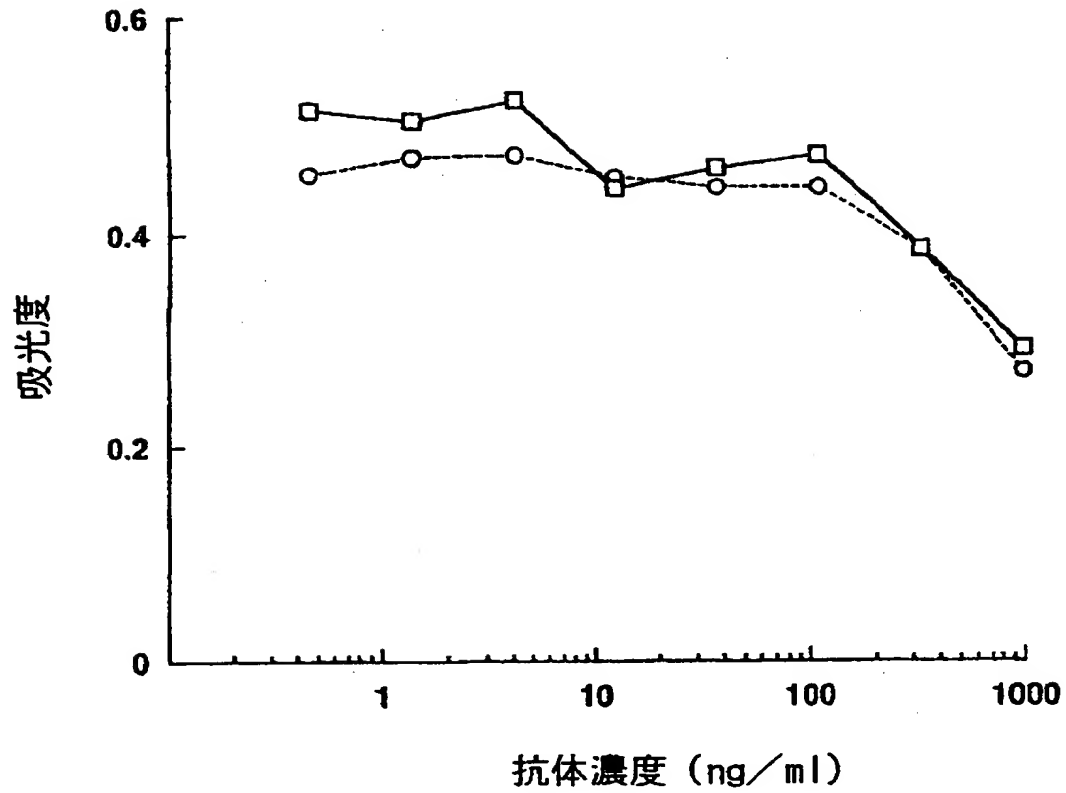


【図29】



- 再構成ヒト抗HM1.24抗体  
(一次デザイン抗体)
- 天然ヒト型化抗体  
(二次デザイン抗体)

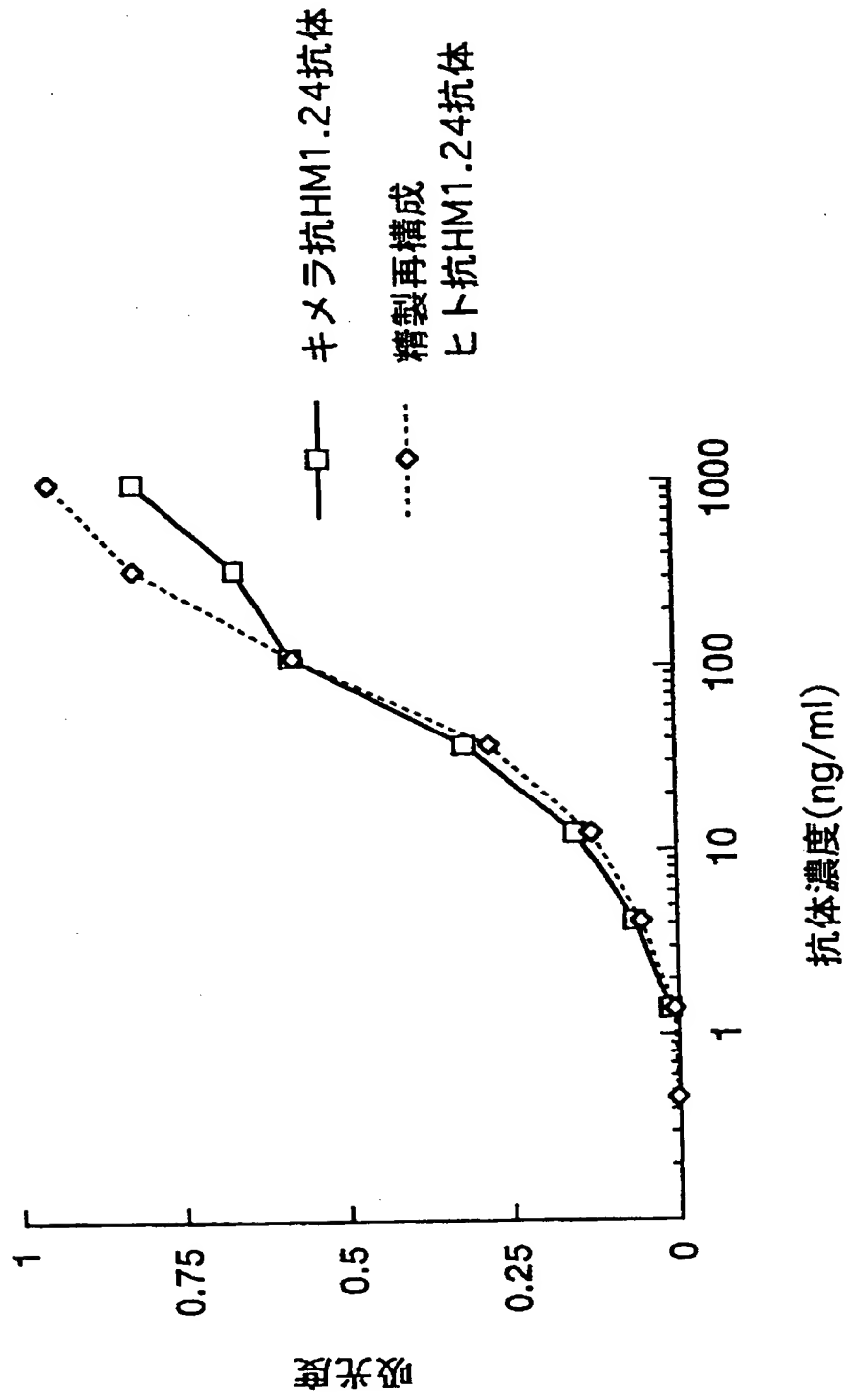
【図30】



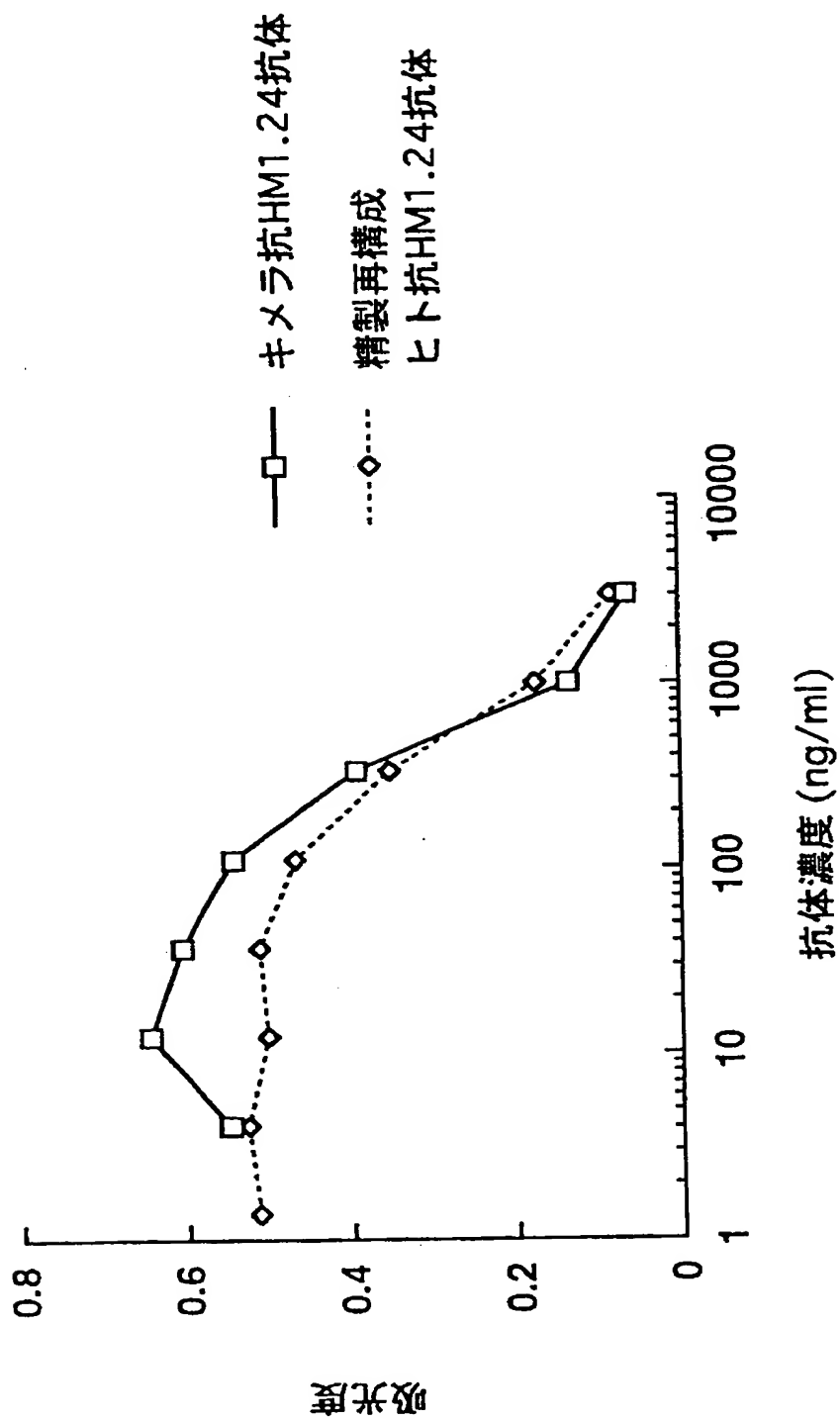
—□— 再構成ヒト抗HM1.24抗体  
(一次デザイン抗体)

—○— 天然ヒト型化抗体  
(二次デザイン抗体)

【図31】



【図 3 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規な再構成ヒト抗体の提供。

【解決手段】 (A) (1) ヒトL鎖C領域、及び(2) ヒトL鎖FR、及びマウス抗HM1.24モノクローナル抗体のL鎖CDRを含んでなるL鎖V領域、を含んで成るL鎖；並びに

(B) (1) ヒトH鎖C領域、及び(2) ヒトH鎖FR、及びマウス抗HM1.24モノクローナル抗体のH鎖CDRを含んで成るH鎖V領域を含んで成るH鎖；

を含んで成る再構成ヒト抗HM1.24抗体。この再構成ヒト抗体の大部分がヒト抗体に由来し、そしてCDRは抗原性が低いことから、本発明の再構成ヒト抗体はヒトに対する抗原性が低く、そしてそれ故に医学療法用として期待される。

【選択図】 なし

【書類名】  
【訂正書類】

職権訂正データ  
特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

000003311

【住所又は居所】

東京都北区浮間5丁目5番1号

【氏名又は名称】

中外製薬株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】

100077517

【住所又は居所】

東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビ  
ル 青和特許法律事務所

【氏名又は名称】

石田 敬

【選任した代理人】

【識別番号】

100087871

【住所又は居所】

東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビ  
ル 青和特許法律事務所

【氏名又は名称】

福本 積

【選任した代理人】

【識別番号】

100088269

【住所又は居所】

東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビ  
ル 青和特許法律事務所

【氏名又は名称】

戸田 利雄

【選任した代理人】

【識別番号】

100082898

【住所又は居所】

東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビ  
ル 青和特許法律事務所

【氏名又は名称】

西山 雅也

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000003311]

1. 変更年月日	1990年 9月 5日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都北区浮間5丁目5番1号
氏 名	中外製薬株式会社